

LA MORPHOGÉNÈSE D'HYPHES TORULEUX CHEZ L'ACTINOMYCÈTE
FRANKIA SPP.

par

Cynthia Lafond-Lambert

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 14 juillet 2014

Le 14 juillet 2014

*le jury a accepté le mémoire de Madame Cynthia Lafond-Lambert
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Sébastien Roy
Directeur de recherche
Département biologie

Professeur Vincent Burrus
Membre interne
Département biologie

Professeur Ryszard Brzezinski
Président-rapporteur
Département biologie

SOMMAIRE

Les bactéries sont sélectionnées par l'environnement qui les entoure. Le moindre changement environnemental (ex. température, pH, salinité) aura un impact sur les cellules bactériennes. Plusieurs moyens sont utilisés par les bactéries pour s'adapter à l'environnement. On retrouve, entre autres, des modifications dans l'expression de gènes induisant des modifications morphologiques et/ou fonctionnelles. La modification morphologique correspond au processus de différenciation cellulaire répondant à un stress ou ayant lieu normalement durant le cycle de vie. La capacité d'adaptation des bactéries permet d'obtenir des différences phénotypiques et génotypiques chez des genres et espèces apparentées.

Les bactéries appartenant au genre *Frankia* ont une morphologie filamenteuse qui a tendance à s'agréger. En plus des filaments, *Frankia* possède des structures spécialisées comme les vésicules et les sporanges. Les vésicules sont le lieu de la fixation d'azote atmosphérique et les sporanges sont l'endroit où se retrouvent les sporangiospores. Les rôles conférés aux spores de *Frankia* sont la reproduction, la dissémination et la survie de l'espèce. Peu d'études ont porté sur les spores de *Frankia*, mais ce qui est connu jusqu'à présent c'est que ce sont des structures avec un métabolisme ralenti, en dormance et ayant un faible taux de germination *in vitro*. En 1985, Diem et Dommergues ont mentionné la présence d'une nouvelle morphologie chez *Frankia* sp. Cj1-82, les *reproductive torulose hyphae* (RTH). Cette nouvelle morphologie n'a pas été étudiée de nouveau jusqu'à tout récemment. Elle consiste en un élargissement de l'hyphe végétatif, un épaississement de la paroi cellulaire et une septation transversale abondante et régulière de l'hyphe. Des comparaisons ont été effectuées avec les sporanges, mais ceux-ci sont différents du point de vue morphologique et métabolique. Les hyphes toruleux nécessitent un bris mécanique pour se disloquer, tandis que les sporanges se lysent de façon spontanée pour libérer les spores. De plus, les hyphes toruleux reprennent une croissance filamenteuse rapidement lorsque remis dans du milieu frais.

Précédemment au laboratoire, une morphologie ressemblant aux RTH de la souche Cj1-82 a été observée sporadiquement et en faible proportion dans les cultures liquides de *Frankia alni* ACN14a. À partir de ces observations, une condition définie et reproductible pour obtenir une différenciation massive en RTH a été déterminée par Audrey Bernèche-D'Amours en 2012. Il a été démontré qu'une concentration finale de 50 mM de KH_2PO_4 dans le milieu BAPS (milieu utilisé usuellement au laboratoire) induisait la différenciation lorsque le pH était d'environ 5,8-5,9. Cet avancement a permis de faire les premières études morphologiques chez cette souche. La morphologie ainsi obtenue a été caractérisée par différentes techniques de microscopie et une étude transcriptomique a permis d'élaborer une liste de 77 gènes dont l'expression était altérée lors de la différenciation.

Au cours de la présente étude, des essais pour améliorer les conditions de différenciation ont été exécutés, pour tenter d'augmenter la viabilité cellulaire et le taux de différenciation. La concentration finale de KH_2PO_4 nécessaire à la différenciation a été déterminée plus précisément, et celle-ci se trouve à 40 mM au lieu de 50 mM. Un ajout graduel de KH_2PO_4 dans le temps n'a pas permis d'observer une meilleure différenciation en RTH avec une mortalité cellulaire moins élevée. Une limitation en azote ne permet pas non plus d'obtenir une amélioration de la différenciation (mortalité et taux de différenciation). Des expériences indépendantes ont permis de déterminer l'importance du potassium et du phosphate dans ce phénomène et l'augmentation du potassium permet la différenciation en hyphes toruleux alors que le phosphate seul ne permet pas la différenciation. Le pH de 5,8-5,9 est essentiel dans la différenciation. De façon à améliorer les connaissances sur les hyphes toruleux, un suivi de cultures différenciées a été effectué. La concentration protéique, l'ADN, le phosphate, le pH, le succinate, le propionate et des biomarqueurs ont été mesurés toutes les semaines durant 2 mois. Pour les RTH, tous les dosages varient faiblement dans le temps tandis que pour les hyphes réguliers les sources de carbone (succinate et propionate) diminuent et les métabolites (ADN, protéines) produits augmentent dans le temps.

La liste de gènes différemment exprimés obtenue par Bernèche-D'Amours (2012), m'a permis d'évaluer la présence de ces gènes d'intérêt dans le génome des souches de *Frankia* présentes dans les banques de données publiques. Plusieurs gènes se retrouvent seulement chez la souche *F. alni* ACN14a. L'expression relative de 10 gènes d'intérêt a été déterminée par q-PCR de façon à confirmer les résultats de transcriptomique. L'expression des gènes modulait comme lors de l'analyse transcriptomique, à l'exception des gènes *thiC*, *atpD* et FRAAL2827. L'étude des RTH augmentera la compréhension du cycle de vie de *Frankia*. La nature filamenteuse de la bactérie rend difficile l'obtention de culture clonale, les cellules individuelles d'hyphes toruleux pourront être utilisées à ces fins. De plus, la morphologie d'hyphes toruleux pourrait faciliter l'obtention de transformants lors de manipulations génétiques.

Mots clés : actinobactérie, *Frankia*, *Frankia alni* ACN14a, différenciation cellulaire, morphologies, hyphes toruleux, RTH ou « *reproductive torulose hyphae* », biomarqueurs, q-PCR.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Pr Sébastien Roy de m'avoir offert ce projet de maîtrise et de m'avoir encadrée et soutenue durant ces deux dernières années. Je me dois aussi de remercier mes deux conseillers de maîtrise, le Pr Ryszard Brzezinski et le Pr Vincent Burrus pour leurs conseils pertinents, leur implication dans le projet et leur disponibilité lors de mes questionnements.

J'aimerais aussi remercier spécifiquement certaines personnes : Gilles Grondin, Anne Vézina et Charles Bertrand pour leurs connaissances en microscopie, Jocelyne Ayotte, pour les analyses de biomarqueurs (Pr Joël Sirois) et les analyses au HPLC, Dominick Matteau pour l'analyse de la qualité de mes échantillons d'ARN et Sylvain Lerat pour son aide dans l'analyse de mes résultats de q-PCR.

Un gros merci aussi à tous les collègues du laboratoire, qui ont fait partie de mes deux ans d'étudiante au cycle supérieur, pour votre esprit critique, votre sens de la coopération et la bonne ambiance au laboratoire. Je remercie ma famille et mes amis de m'avoir encouragée dans mon désir de poursuivre mes études de 2^e cycle et de s'être intéressés à mon projet (même si pour quelques-uns la science ne faisait pas partie de leurs champs d'intérêt). Vous m'avez fait vulgariser mes recherches en revenant aux bases et en faisant des homologues avec des exemples de la vie courante, mais l'exercice était bon pour mon cheminement! Un dernier remerciement à mon copain Sébastien A. B. Roy pour nos discussions scientifiques et ses nombreux encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xiv
INTRODUCTION	16
1.1 Morphologie et différenciation cellulaire	16
1.2 Microorganismes étudiés	17
1.2.1 <i>Frankia</i> spp.	17
1.2.2 Morphologies	18
1.2.3 Caractéristiques particulières aux hyphes toruleux	20
1.3 Effet des différents stress sur la différenciation en hyphes toruleux	21
1.3.1 Homéostasie du pH	21
1.3.2 L'importance du potassium dans les cellules	24
1.3.3 L'importance du phosphate chez les cellules	25
1.4 Gènes d'intérêt dans la différenciation en hyphes toruleux	27
1.4.1 <i>kdpC</i>	27
1.4.2 FRAAL2084	32
1.4.3 <i>sigH</i>	33
1.4.4 FRAAL3700	34
1.4.5 <i>ileS</i>	34
1.4.6 <i>capD</i>	35
1.4.7 FRAAL2028	36
1.4.8 <i>thiC</i>	37
1.4.9 FRAAL2827	38
1.4.10 <i>atpD</i>	39
1.5 Les hypothèses et objectifs du mémoire	39

CHAPITRE 1 : AMÉLIORATION DES CONDITIONS CULTURALES POUR L'OBTENTION D'UN MEILLEUR RENDEMENT EN HYPHES TORULEUX VIABLES ET ÉLARGISSEMENT DE LA PRODUCTION À UN PLUS GRAND NOMBRE DE SOUCHES.41

1.1 Mise en contexte	41
1.2 Matériels et méthodes	42
1.2.1 Souches bactériennes utilisées	42
1.2.2 Préparation des inocula	43
1.2.3 Milieux de culture modifiés	43
1.2.4 Criblage en microplaques	44
1.2.5 Évaluation de la respiration microbienne par coloration au MTS/PMS	44
1.2.6 Microscopie à épifluorescence	45
1.2.7 Microscopie électronique à transmission	46
1.2.8 Dosage des constituants cellulaires et du milieu (protéines, ADN, phosphate, biomarqueurs, sources de carbone)	47
1.3 Résultats	50
1.3.1 Évaluation la capacité de différenciation de souches de <i>Frankia</i> avec ajout temporel ou instantané de l'agent inducteur	50
1.3.2 Détermination du stimulus impliqué dans la différenciation en hyphes toruleux	55
1.3.3 Intermédiaires du cycle de Krebs	59
1.3.4 Détermination de l'effet d'une limitation en azote exogène sur la différenciation	60
1.3.5 Évaluation de l'état cellulaire de <i>Frankia</i> différenciée dans le temps	64

CHAPITRE 2 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION EN HYPHES TORULEUX.....69

2.1 Mise en contexte	69
2.2 Matériels et méthodes	69
2.2.1 Alignements des génomes séquencés	69
2.2.2 Extraction d'ARN	70
2.2.3 ADNe	71
2.2.4 PCR quantitative	71
2.3 Résultats	74
2.3.1 Alignement des génomes séquencés	74
2.3.2 Mise au point de la technique de q-PCR et premières analyses de q-PCR	74
2.3.3 Évaluation de l'expression relative des gènes au fil des jours par q-PCR	79
3.1 Évaluation de la capacité de différenciation de souches de <i>Frankia</i> avec ajout temporel ou instantané de l'agent inducteur	86
3.2 Détermination du stimulus impliqué dans la différenciation en hyphes toruleux	88
3.3 Intermédiaires du cycle de Krebs	89

3.4 Détermination de l'effet d'une limitation en azote exogène sur la différenciation en hyphes toruleux	90
3.5 Évaluation de l'état cellulaire de <i>Frankia</i> différencié dans le temps.....	90
3.6 Alignement des gènes d'intérêts de <i>Frankia alni</i> ACN14a avec le génome de d'autres souches.....	92
3.7 Évaluation de l'expression relative des gènes au fil des jours par q-PCR.....	92
CONCLUSION	95
ANNEXE	98
BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	pourcentage
° C	degré Celsius
σ	sigma
λ	longueur d'onde
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AIR	aminoimidazole ribotide
ARA	essai de réduction de l'acétylène (<i>acetylene reduction assay</i>)
ARN	acide ribonucléique
ARNt	acides ribonucléiques de transfert
ATP	adénosine triphosphate
CT	cycle seuil
dNTPs	mélange des quatre désoxyribonucléotides
FAD	flavine adénine dinucléotide
FPM	force proton motrice
g	gramme
G	gauge
G+C	taux de guanine et cytosine
g/l	gramme par litre
h	heure
H ⁺	proton
HMP-P	4-amino-5-hydroxyméthyl-2-méthyl pyrimidine phosphate
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
IPM	isomérases phosphomannoses
K ⁺	ion potassium

KCl	chlorure de potassium
KH_2PO_4	phosphate de potassium monobasique
kPa	kilopascal
l	litre
M	molaire
mg	milligramme
MET	microscopie électronique à transmission
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
mN	millinormale
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium, <i>inner salt</i>
MTS/PMS	solution de MTS et PMS
NAD, NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
nm	nanomètre
N	normale
N_2	azote atmosphérique
NaH_2PO_4	phosphate de sodium monobasique
NH_3	ammoniac
NH_4^+	ammonium
NH_4Cl	chlorure d'ammonium
NoRT	sans transcriptase inverse
pb	paire de base
pH	potentiel hydrogène
P_i	orthophosphate inorganique
PMS	méthosulfate de phénazine
polyP	polyphosphate
PVP-40	polyvinylpyrrolidone

q-PCR	polymérase en chaîne quantitative
REDOX	oxydoréduction
RIN	nombre de l'intégrité de l'ARN
RTH	hyphes toruleux (<i>reproductive torulose hyphae</i>)
sp.	espèce
spp.	espèces (ensemble des)
ssp.	sous-espèce
THZ-P	4-méthyl-5-(2-hydroxy-éthyl)-thiazole
TP	température pièce (22-25 °C)
TPP	thiamine pyrophosphate
μl	microlitre
μg	microgramme
μg/ml	microgramme par millilitre
μm	micromètre
x	fois
x g	force « g »

LISTE DES TABLEAUX

1. Liste des gènes différemment exprimés chez les hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a tiré de Bernèche-D'Amours (2012).	28
2. Valeurs des longueurs d'onde utilisées pour chacun des biomarqueurs potentiels (Sirois <i>et al.</i> , 2012).	48
3. Effet de la concentration finale en KH_2PO_4 sur la différenciation en hyphes toruleux chez les différentes souches de <i>Frankia</i>	51
4. Les oligonucléotides utilisés pour les essais de q-PCR.	73
5. Gènes différemment exprimés chez les hyphes toruleux et végétatifs de la souche <i>Frankia alni</i> ACN14a et leur présence chez les autres souches de <i>Frankia</i> séquencées.	76
6. Détermination de la concentration et la qualité des échantillons d'ARN extraits.....	78
7. Détermination de la concentration et la qualité des échantillons d'ARN extraits pour le suivi dans le temps de l'expression génique.....	80

LISTE DES FIGURES

1. Les morphologies retrouvées chez le genre <i>Frankia</i>	18
2. Ontogénèse des vésicules dans un milieu sans azote.	20
3. Exemples d'adaptation au pH acide et alcalin de certaines bactéries neutrophiles ayant un métabolisme respiratoire (<i>Escherichia coli</i>) ou non (<i>Streptococcus mutans</i> et <i>Enterococcus hirae</i>).	23
4. Schématisation de l'acquisition de phosphate par les bactéries.	26
5. Régulation de l'opéron <i>kdpFABC</i>	32
6. Schématisation du système <i>trk</i> dans la membrane des bactéries, <i>trkA</i> se retrouve du côté cytoplasmique.....	33
7. Schématisation de la conversion du dTDP-glucose en dTDP-4-céto-6-déoxyglucose. La réaction est catalysée par la dTDP-glucose 4,6-déshydratase.	36
8. Catabolisme de la thiamine pyrophosphate (TPP) avec ThiC un cofacteur important dans le métabolisme des carbohydrates.	38
9. Respiration cellulaire déterminée à l'aide du MTS-PMS et de la spectrophotométrie à 490 nm à différentes concentrations de KH_2PO_4 chez 7 souches de <i>Frankia</i> ;	54
10. Morphologie cellulaire observée à la concentration de KH_2PO_4 permettant une différenciation.	55
11. Détermination de l'importance du potassium et du phosphate indépendamment dans la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a.	57
12. MET de <i>Frankia alni</i> ACN14a dans les conditions pour comparer l'état cellulaire des cellules dans différents milieux.	58

13. Détermination de l'épaisseur des parois cellulaires de <i>Frankia alni</i> ACN14a dans différentes conditions de culture à partir des images obtenues par MET à un grossissement de 5000X.	58
14. Schématisation du cycle de Krebs.	60
15. Respiration cellulaire déterminée à l'aide du MTS-PMS et de la spectrophotométrie à 490 nm de différents intermédiaires du cycle de Krebs chez <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	59
16. Effet de la prolifération de vésicules sur la différenciation en hyphes toruleux chez <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	63
17. Suivis de cultures de BAPS pH 6,7 et du BAPS 50 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,8-5,9.....	65
18. Dosage fluorimétrique des biomarqueurs sur des cultures de <i>Frankia alni</i> ACN14a en hyphes végétatifs (gris) ou en hyphes toruleux (blanc).....	68
19. Expression relative de gènes étudiés au jour 8 et au jour 14.....	79
20. Résultats cumulatifs du suivi dans le temps de la valeur d'expression relative moyenne obtenue pour chaque gène étudié.	81
21. Expression relative des gènes de <i>Frankia alni</i> ACN14a différenciée en hyphes toruleux à différents temps de culture déterminée par q-PCR par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$	83
22. Détermination de la présence de corrélations entre les gènes par des régressions linéaires.	85

INTRODUCTION

1.1 Morphologie et différenciation cellulaire

Afin de subsister, les cellules bactériennes doivent s'adapter à leur environnement et se reproduire et pour ce faire, elles adoptent divers morphotypes. Chaque morphotype possède des avantages et permet d'améliorer la valeur adaptative. Une grande diversité de morphologie est retrouvée chez les bactéries; les formes et arrangements cellulaires sont très variés (coques, bâtonnets, spirales, filaments, droits, courbés ou des appendices, arrangés en paires, chaînes, grappes ou agrégats) (Young, 2006; Zinder et Dworkin, 2006). La taille des microorganismes est aussi différente; les plus petits mesurant moins de 1 μm , les plus gros pouvant être visibles à l'œil nu. L'environnement des bactéries applique une pression sélective qui avantage les morphotypes les mieux adaptés pour la survie de l'espèce (Young, 2006). Par exemple, lorsque le milieu est pauvre en nutriments, la forme ayant le plus grand rapport surface-volume sera privilégiée. Pour pallier aux pressions sélectives, les bactéries possèdent des mécanismes leur permettant de modifier leur morphologie. Ces modifications sont soit temporaires (changement de phase de croissance), répétitives (cycle de vie dimorphique ou pléomorphique), ou impliquent le développement de structures spécialisées (spores, hétérocystes, tige d'ancrage, flagelle) (Young, 2007). Un exemple bien connu dans la littérature est *Caulobacter crescentus* qui possède un cycle de vie contenant deux morphotypes différents (Young, 2006; Zinder et Dworkin, 2006). Le premier morphotype consiste en un bâtonnet courbé possédant une tige d'ancrage permettant de se fixer à une surface pour l'acquisition de nutriments et le deuxième est un bâtonnet flagellé permettant la motilité.

1.2 Microorganismes étudiés

1.2.1 *Frankia* spp.

Frankia est un actinomycète de la famille des *Frankiaceae* se retrouvant dans le sol (Chaia *et al.*, 2010). Le nom *Frankia*, qui décrivait à l'époque les endophytes formant des nodules chez les plantes non légumineuses, a été donné par Brunchorst en 1886 en l'honneur du professeur A. B. Frank (Baker et Schwintzer, 1990; Wheeler, Akkermans et Berry, 2008). Encore aujourd'hui, cette famille comprend seulement le genre *Frankia*. C'est une bactérie à Gram positif très riche en G+C (entre 66-77%) (Benson et Silvester, 1993). La croissance de ce microorganisme est très lente, elle a un temps de doublement de 15-48 h et certaines souches peuvent prendre jusqu'à une semaine pour se diviser. La bactérie *Frankia* est hétérotrophe et possède un métabolisme aérophile ou microaérophile. Elle produit des spores et fixe l'azote atmosphérique (Baker et Schwintzer, 1990). Elle utilise différentes sources de carbone comme de courtes chaînes d'acide gras qui comprennent le propionate et des intermédiaires du cycle du citrate comme le succinate (Valverde et Huss-Danell, 2008). De plus, quelques souches utilisent aussi des sucres. *Frankia* forme une symbiose avec plus de 220 espèces de plantes de huit familles et de trois ordres : les fagales, les rosales et les cucurbitales (Valdés, 2008; Chaia *et al.*, 2010; Persson *et al.*, 2011). *Frankia* est incorporée au niveau des poils racinaires des plantes puis il y a formation d'une structure appelée nodule où il y a la fixation de l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3) ou en ion ammonium (NH_4^+) par les microorganismes (Schwencke et Carú, 2001; Chaia *et al.*, 2010). Les plantes, ne pouvant pas assimiler directement le N_2 , bénéficieront du NH_4^+ produit par *Frankia*. En échange, elles mettent à la disposition des bactéries les produits carbonés synthétisés lors de la photosynthèse. Cette association permet aux plantes de croître dans des endroits moins propices et de permettre à la succession végétale primaire de débiter de façon efficace.

1.2.2 Morphologies

Frankia possède trois morphologies normalement observées en culture pure et en symbiose (*in planta*) : l'hyphe végétatif, le sporange qui contient des spores ovoïdes et la vésicule (Baker et Schwintzer, 1990). Certaines d'entre elles, comme les sporangiospores et les vésicules, sont des structures spécialisées ayant des fonctions précises (reproduction, dissémination et fixation d'azote). Certaines souches de *Frankia* présentent également une quatrième morphologie, les RTH « *Reproductive torulose hyphae* ». Diem et Dommergues l'ont découverte en 1985 et, depuis, elle n'a jamais été étudiée (figure 1).

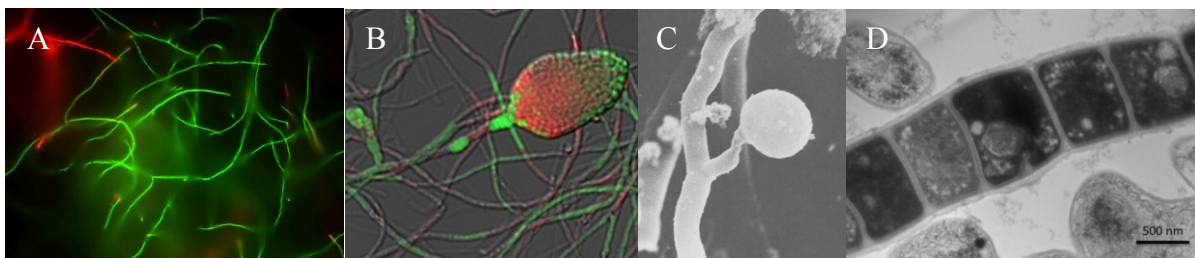


Figure 1 : Les morphologies retrouvées chez le genre *Frankia*. (A) L'hyphe végétatif de *Frankia alni* ACN14a, Lafond-Lambert C. (non publié), (B) le sporange de *Frankia* sp. ARgP5, Beaudin J. (non publié), (C) la vésicule de *Frankia* sp. AN1, tirée de Hafeez et al.1984 et (D) l'hyphe toruleux de *Frankia alni* ACN14a, tirée de Bernèche-D'Amours (2012).

Les hyphes végétatifs sont la morphologie majoritairement observée en milieu de culture. Ce sont de longs filaments peu septés de 0,5 μm de largeur qui sont plus ou moins agrégés (Chaia *et al.*, 2010). La croissance des hyphes de *Frankia* à lieu par division des cellules apicales et de nouveaux embranchements sont alors produits. Ensuite, il est possible d'observer des sporangiospores, des structures qui contiennent les spores. Les sporangiospores peuvent être

terminaux ou intercalaires (Chaia *et al.*, 2010). Les spores matures sont de forme polygonale, possèdent une paroi épaisse en plus d'une membrane externe et sont non-mobiles (Lechevalier et Lechevalier, 1990). Le rôle des spores est la reproduction et la survie (Krumholz *et al.*, 2003). Lors de la germination des spores, il y a reprise de croissance en hyphes réguliers. Il a toutefois été démontré que le taux de germination des spores de *Frankia* était bas *in vitro* (Krumholz *et al.*, 2003).

Les vésicules sont des structures spécialisées sphériques recouvertes d'une enveloppe lipidique multicouche (3-4,5 nm) constituée d'hopanoïdes qui protège la nitrogénase de l'oxygène (Fontaine *et al.*, 1984; Murry *et al.*, 1984; Berry *et al.*, 1993). Cette enveloppe lipidique a une fonction analogue à la membrane des hétérocystes de cyanobactéries comme *Anabaena* qui est de permettre la réduction de l'azote via l'enzyme nitrogénase dans un site exempt d'oxygène. De plus, les vésicules ont un haut taux de respiration cellulaire pour séquestrer les molécules d'oxygène ayant pu s'introduire malgré la couche lipidique. L'enveloppe des vésicules est constituée de deux hopanoïdes tandis que les hétérocystes possèdent des glycolipides. Un des hopanoïdes, le bactériohopantétrol phénylacetate monoester et représente 30 à 50 % de tous les lipides chez *Frankia*. Les hopanoïdes favorisent la stabilité des membranes. En laboratoire il est possible d'induire la formation de vésicule en limitant l'azote dans le milieu de culture (Murry *et al.*, 1984). L'activité de la nitrogénase peut être mesurée via la réduction d'acétylène en éthylène par chromatographie en phase gazeuse. (Tjepkema *et al.*, 1981; Murry *et al.*, 1984).

Les provésicules sont des structures non spécialisées qui ne fixent pas l'azote atmosphérique. Les provésicules ont un développement désynchronisé et deviennent des vésicules matures. Lors de la maturation, les vésicules grossissent et l'activité de la nitrogénase augmente pour ainsi permettre la fixation d'azote. Suite à la phase de développement, la structure des vésicules se désagrège et leur membrane devient irrégulière (figure 2) (Fontaine *et al.*, 1984).

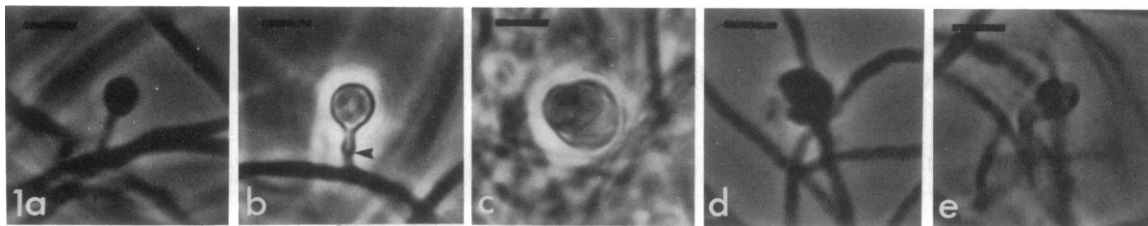


Figure 2 : Ontogénèse des vésicules dans un milieu sans azote. (1a) Provésicules, (b) vésicules matures, (c) très grosse vésicule mature au pourtour irrégulier, (d) vésicule endommagée et (e) vésicule fantôme. Tirée de Fontaine et al. (1984).

1.2.3 Caractéristiques particulières aux hyphes toruleux

En 1985, Diem et Dommergues ont publié un article traitant de la morphologie des *reproductive torulose hyphae* (RTH), retrouvés chez la souche *Frankia* sp. Cj1-82. Les RTH sont aussi appelés les hyphes toruleux. Avant ce moment, les hyphes toruleux étaient identifiés comme des cellules ressemblant à des sporanges. Plus de 25 ans se sont écoulés entre la première étude sur les RTH (Diem et Dommergues, 1985) et la deuxième (Bernèche-D'Amours, 2012). En étudiant cette morphologie, on constate que les hyphes toruleux sont caractérisés par un élargissement de l'hyphe végétatif, une septation abondante et régulière de l'hyphe et une présence de parois doubles entre les cellules. Les sporanges, quant à eux, sont des amas de spores polygonales où celles-ci sont libérées spontanément lorsqu'elles sont matures. Les hyphes toruleux ne se disloquent pas aussi facilement, ils doivent subir un bris mécanique. De plus, les hyphes toruleux ont une reprise de croissance rapide en hyphes végétatifs, lorsque remis dans un milieu frais. Les sporangiospores sont en dormance et doivent être activées pour former le tube germinatif, la reprise de croissance est plus longue dans ce cas-ci (Diem et Dommergues, 1985).

Dernièrement, le développement d'un milieu de culture permettant d'obtenir massivement des hyphes toruleux chez la souche *Frankia alni* ACN14a a permis d'amorcer l'étude de cette morphologie (Bernèche-D'Amours, 2012). Les structures cellulaires obtenues ont été observées par différentes méthodes de microscopie pour identifier les différences phénotypiques entre les hyphes végétatifs et les hyphes toruleux. De plus, le transcriptome des hyphes toruleux a été comparé avec celui des hyphes végétatifs pour mettre en évidence les gènes jouant un rôle dans la différenciation cellulaire (Bernèche-D'Amours, 2012).

1.3 Effet des différents stress sur la différenciation en hyphes toruleux

Des stress causés par l'environnement peuvent survenir lors de la croissance des bactéries. Parmi les stress observables, il y a les chocs de températures, les stress s'attaquant à l'enveloppe cellulaire, les stress oxydatifs, les stress dus à l'oxygène, les chocs osmotiques, les différences de pH, la présence de métaux et les dommages à l'ADN. Les bactéries possèdent certaines stratégies leur permettant de survivre dans des conditions moins favorables. Au laboratoire, nous avons découvert que l'acidification du milieu de culture et l'augmentation de la concentration en potassium (K^+) et en phosphate (PO_4^{3-}) provoquent la différenciation en hyphes toruleux. L'ajout de K^+ et de PO_4^{3-} dans le milieu de culture pourrait entraîner une dérégulation de la pression de part et d'autre de la paroi cellulaire, ce phénomène est appelé choc osmotique.

1.3.1 Homéostasie du pH

Le pH peut avoir un impact sur le métabolisme, les structures cellulaires et le transport de molécules (Booth, 1985; Krulwich *et al.*, 2011). Les bactéries possèdent différentes stratégies pour contrer les variations de pH. Le niveau d'activité de la force proton motrice (FPM) varie

en fonction du pH. La FPM est un gradient électrochimique de protons (H^+) de part et d'autre de la membrane cellulaire (Booth, 1985; Krulwich *et al.*, 2011). Deux composantes sont en jeux dans la FPM; la différence de pH entre le cytoplasme et l'environnement extérieur et le potentiel électrique transmembranaire (Krulwich *et al.*, 2011). Les variations dans ces deux composantes provoquent un déséquilibre de l'homéostasie du pH intracellulaire. Les ATPases sont des pompes permettant de retrouver l'homéostasie. Les pompes à proton se retrouvent dans les parois cellulaires et sont importantes pour la respiration cellulaire et dans le potentiel d'oxydoréduction (REDOX) (Krulwich *et al.*, 2011). Par exemple, *Escherichia coli*, un microorganisme neutrophile, augmente l'expression de la chaîne de respiration en condition acide pour permettre la sortie de H^+ . Chez les bactéries non respiratoires neutrophiles, il y a une augmentation de l'activité hydrolase de l'ATPase F_1F_0 qui permet une sortie des H^+ dans des conditions acides (figure 3). Dans la majorité des cas, il doit y avoir réversion de ces processus lorsque l'environnement est alcalin. En conditions alcalines, les bactéries doivent pouvoir laisser entrer les ions H^+ via des symporteurs. Plusieurs symporteurs, comme le Na^+/H^+ et le K^+/H^+ , sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie du pH, des cations et de l'osmolarité.

Grâce à certaines enzymes, il est possible via le métabolisme bactérien de contrôler la consommation et la production d'ion H^+ . En condition acide, des hydrogénases et des décarboxylases permettent la consommation d'ions H^+ cytoplasmique. Tandis qu'en condition alcaline, c'est plutôt une augmentation de l'expression des gènes responsables de la production d' H^+ comme les désaminases (Foster, 2004).

Des mécanismes passifs peuvent également contrôler l'homéostasie du pH. Parmi ceux-ci, il y a la modification de la composition lipidique de la membrane cellulaire et le nombre de porines pour empêcher l'entrée d'ions H^+ . Par exemple, dans un environnement alcalin, il y a la production de polymères d'acides teïchuroniques au niveau de la paroi cellulaire qui se lie fortement aux ions H^+ permettant de réduire le pH localement.

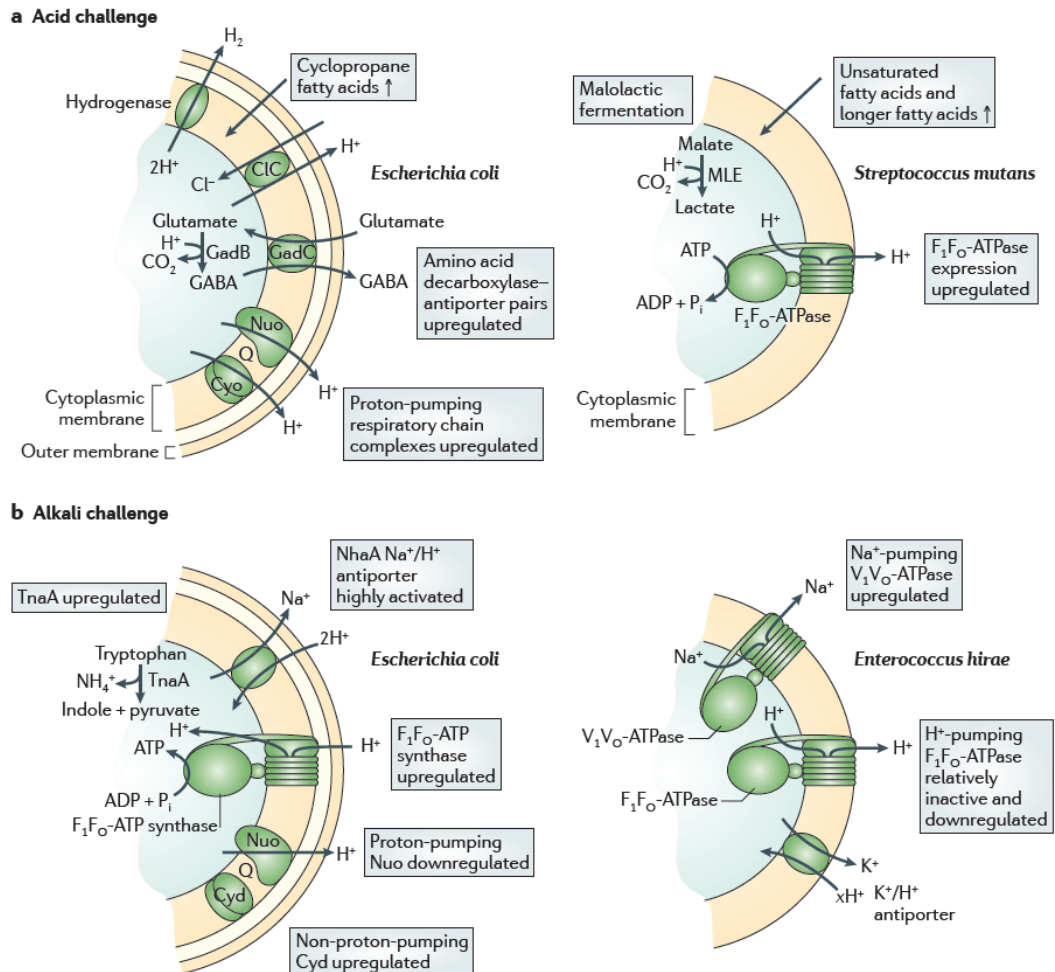


Figure 3 : Exemples d'adaptation au pH acide et alcalin de certaines bactéries neutrophiles ayant un métabolisme respiratoire (*Escherichia coli*) ou non (*Streptococcus mutans* et *Enterococcus hirae*). En général, ce sont des systèmes de transport actifs et passifs de protons. Tirée de Krulwich et al. (2011).

1.3.2 L'importance du potassium dans les cellules

Le potassium (K^+) est le cation le plus important au niveau intracellulaire, (Alahari *et al.*, 2001) l'évolution a permis aux cellules vivantes d'accumuler le K^+ et d'exclure le sodium (Na^+) de façon générale (Alahari *et al.*, 2001; Epstein, 2003; Yan *et al.*, 2011). Seulement les bactéries halophiles survivent à de fortes concentrations de Na^+ . Le K^+ a quatre rôles : (i) un soluté osmotique, (ii) un activateur enzymatique, (iii) un régulateur interne de pH et (iv) un second messenger (Alahari *et al.*, 2001; Epstein, 2003; Yan *et al.*, 2011). Il y a deux réponses possibles au K^+ par les bactéries. Pour les bactéries qui ont une croissance dans une osmolarité intracellulaire élevée, le K^+ et dans des cas particuliers le Na^+ sont accumulés dans le cytoplasme. La plupart des bactéries utilisent le K^+ seulement à basse osmolarité intracellulaire et produisent des molécules polaires neutres appelées composés compatibles (exemples: bétaïne, proline, ectoïne et tréhalose). Dans ce dernier cas, le K^+ agit comme second messenger et stimule l'accumulation de composés compatibles (Epstein, 2003).

Le K^+ est important dans le maintien de la pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, cette pression est appelée la turgescence (Alahari *et al.*, 2001). La turgescence est nécessaire pour la croissance et la détermination de la morphologie de la bactérie (Epstein, 2003). De plus, la turgescence est le signal et la finalité du transport du K^+ de part et d'autre de la paroi cellulaire; un changement dans la concentration intracellulaire de K^+ va entraîner une modification de la turgescence, induisant un signal pour contrôler les transporteurs à K^+ (Epstein, 2003).

Il y a différents systèmes qui permettent le transport du K^+ . Le système Trk est généralement exprimé de façon constitutive et est un symporteur avec un proton (Epstein, 2003). Un système similaire, Ktr, est retrouvé chez plusieurs bactéries, mais absent chez les archées. Le système Ktr est plutôt un symporteur de K^+/Na^+ . Le troisième système, le Kdp, est une

ATPase de type P qui est inductible par un changement dans la turgescence de la cellule. Celle-ci utilise l'ATP et n'est pas affectée par la FPM (Epstein, 2003). Certains autres systèmes de transport existent chez les bactéries, mais ceux-ci ont été moins étudiés, car leur affinité pour le K^+ est moindre.

1.3.3 L'importance du phosphate chez les cellules

Le phosphate est un constituant essentiel des cellules vivantes, il possède différentes fonctions; de structure, d'énergie et de conservation/transfert d'informations (Blank, 2012). Il est présent dans les acides nucléiques (ADN et ARN), les phospholipides, les lipopolysaccharides et différents solutés cytoplasmiques (Hirota *et al.*, 2010; Bergwitz et Jüppner, 2011; Blank, 2012). L'orthophosphate inorganique (P_i) est la forme de phosphate préférentielle des bactéries, il est peu disponible dans l'environnement, car il forme des sels avec le calcium et d'autres cations (Martín *et al.*, 2012). Plusieurs microorganismes accumulent l'excès de P_i en polyphosphate (polyP), un polymère linéaire de plus de 1000 résidus de P_i (Hirota *et al.*, 2010). Le polyP peut servir comme source de phosphate pour la biosynthèse d'acides nucléiques et de phospholipides lorsque les conditions sont limitantes en phosphate. Plusieurs bactéries accumulent le polyP lorsque les conditions nutritionnelles sont déséquilibrées ou défavorables pour la croissance.

Le P_i est transporté à l'intérieur des cellules via le système « P_i inorganic transport » (Pit) qui est exprimé constitutivement (Hirota *et al.*, 2010). Le système Pit transloque les P_i en symport avec des cations métalliques divalents comme le Zn^{2+} (figure 4) (Bergwitz et Jüppner, 2011). Les P_i transloqués dans la cellule seront convertis en polyP. En condition limitante de phosphate, un deuxième système de transport est mis en fonction, le « P_i -specific transport » (Pst) qui a une plus grande spécificité pour le phosphate (figure 4). Le système Pst est un transporteur de la famille des « ATP binding cassette » (ABC), chez *Escherichia coli* le

The diagram illustrates the polyphosphate (polyP) cycle in *E. coli*. It shows the conversion of inorganic phosphate (P_i) to polyphosphate (polyP) and back to P_i . Key components include:

- Phosphate-specific Transport (PstSCAB)** and **Phosphate Inorganic Transport (PitA/B)** across the cell membrane.
- Phosphotransferase system (PTS)** components: **PhnCDE** and **PhnG-M**.
- Polyphosphate kinase (PPK)** and **exopolyphosphatase (PPX)**.
- Inducible components (black boxes)** under P_i limitation or *phoU* mutation: **PhnCDE**, **PhnG-M**, **PstSCAB**, and **PitA/B**.
- Chemical structures** of P_i , **Org- P_i** , and **polyP** are shown.

La biosynthèse de certains métabolites secondaires est régulée négativement avec une concentration élevée en P_i (Martín *et al.*, 2012). Le mécanisme n'est pas bien caractérisé, mais s'avère important pour la synthèse de différentes classes de métabolites secondaires comme

les macrolides, les tétracyclines, les anthracyclines, les ansamycines, les composés polyéthers, les aminoglycosides et les métabolites dérivés des acides aminés. Chez *Streptomyces lividans*, le système à deux composantes PhoR-PhoP, qui répond à la faible concentration de P_i , contrôle la biosynthèse d'antibiotiques (Martín *et al.*, 2012).

1.4 Gènes d'intérêt dans la différenciation en hyphes toruleux

Les travaux précédents ont permis de déterminer une liste de gènes (tableau 1) différemment exprimés chez les hyphes toruleux en comparaison avec les hyphes normaux à l'aide d'une technique de séquençage d'ARN à haut débit (Bernèche-D'Amours, 2012). Voici un aperçu des fonctions et intérêts reliés à dix gènes retrouvés dans la liste.

1.4.1 *kdpC*

Le système Kdp coderait pour un transporteur de potassium. Il aurait une haute affinité et spécificité pour le K^+ (Epstein, 2003). Chez *E. coli*, l'opéron *kdpFABC* code pour une ATPase ayant pour rôle le transport du potassium. *kdpA-B* et *C* sont essentiels pour le fonctionnement de l'ATPase, donc la translocation de potassium. La régulation de l'expression de l'opéron se fait via *kdpD* qui détectera les changements de turgescence au niveau de la paroi cellulaire et activera si nécessaire *kdpE*, le régulateur de l'opéron *kdpFABC* (figure 5). *kdpC* est une protéine chaperonne de 190 résidus avec un ancrage en forme d'hélice dans la paroi cellulaire nécessaire pour l'assemblage du complexe (Epstein, 2003). La protéine posséderait un domaine C-terminal qui a une affinité pour l'ATP (fonction d'un transporteur ABC) qui rendra plus stable la liaison de l'ATP à *kdpB* (Greie, 2011). Il y aurait donc une coopération entre *kdpB* et *kdpC*. La Kdp-ATPase est largement représentée chez les bactéries à Gram-négative et à Gram-positive, les archées et les cyanobactéries. Lorsque la concentration extracellulaire en

Tableau 1 : Liste des gènes différemment exprimés chez les hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a tiré de Bernèche-D'Amours (2012).

Gene	GenBank accession	Mean raw count		Fold Change ¹	FDR p-value ¹	Function
		RH	TH			
<i>cysN</i>	YP_712337.1	0	226	∞	1,9 X 10 ⁻³	ATP-sulfurylase subunit 1
<i>kdpC</i>	YP_715465.1	0	93	∞	0	P-type ATPase subunit high-affinity potassium transport system subunit C
<i>capD</i>	YP_715815.1	67	8378	108,1	1,6 X 10 ⁻⁴	dTDP-glucose 4,6-dehydratase transmembrane protein
<i>thiC</i>	YP_711068.1	79	9611	99,5	0	thiamine biosynthesis protein
<i>braG</i>	YP_711002.1	357	6544	15,6	0	high-affinity branched-chain amino acid ABC transporter ATP binding protein
<i>sigH</i>	YP_716132.1	917	10580	11,1	0	SigH RNA polymerase sigma factor
<i>tmk</i>	YP_716707.1	426	3401	7,6	8,2 X 10 ⁻¹⁴	thymidylate kinase
<i>iscS</i>	YP_715302.1	477	3657	6,5	0	cysteine desulfurase
<i>end8</i>	YP_715876.1	242	1178	4,0	0,02	endonuclease VIII
<i>ileS</i>	YP_712435.1	358	1435	3,3	0	isoleucyl-tRNA synthetase
<i>atpD</i>	YP_716074.1	24669	2036	-16,9	0,04	ATP synthase F0F1 subunit beta
<i>glyA</i>	YP_711383.1	53	0	-∞	2,0 X 10 ⁻⁷	serine hydroxymethyltransferase
FRAAL3312	YP_713521.1	0	639	∞	7,3 X 10 ⁻³	hypothetical protein
FRAAL3138	YP_713349.1	0	617	∞	0,038	hypothetical protein
FRAAL3513	YP_713719.1	0	198	∞	4,0 X 10 ⁻⁷	acyl-CoA dehydrogenase
FRAAL4726	YP_714910.1	0	93	∞	0	aldoketoreductase
FRAAL0433	YP_710720.1	0	27	∞	1,4 X 10 ⁻⁵	hypothetical protein
FRAAL1349	YP_711599.1	13	4281	288,7	0	hypothetical protein
FRAAL3700	YP_713904.1	27	10629	214,2	3,7 X 10 ⁻¹⁰	transcriptional regulator
FRAAL5031	YP_715211.1	2207	536415	194,7	0	hypothetical protein
FRAAL0329	YP_710616.1	13	2673	169,9	0,017	substrate-binding ABC transporter protein component

FRAAL0828	YP_711095.1	93	13826	129,7	$2,0 \times 10^{-5}$	hypothetical protein
FRAAL3685	YP_713889.1	13	2509	105,2	0,044	hypothetical protein
FRAAL2459	YP_712678.1	598	76748	95,5	0	hypothetical protein
FRAAL3389	YP_713598.1	53	3557	63,7	$1,2 \times 10^{-8}$	hypothetical protein
FRAAL5034	YP_715214.1	1218	74162	51,8	0,025	hypothetical protein
FRAAL1784	YP_712022.1	16	797	45,1	$2,7 \times 10^{-6}$	hypothetical protein
FRAAL3599	YP_713804.1	26	890	34,0	$4,8 \times 10^{-5}$	hypothetical protein
FRAAL2995	YP_713207.1	146	4741	27,6	0,011	hypothetical protein
FRAAL3826	YP_714029.1	16	371	23,0	0	camphor 5-monooxygenase
FRAAL2867	YP_713079.1	13	346	22,8	$4,2 \times 10^{-14}$	SAM-dependent methyltransferase involved in tRNA-Met maturation
FRAAL3033	YP_713244.1	173	3819	21,9	0,048	hypothetical protein
FRAAL0899	YP_711162.1	13	528	21,3	$2,1 \times 10^{-8}$	hypothetical protein
FRAAL4910	YP_715093.1	13	531	20,9	0,04	hypothetical protein
FRAAL2028	YP_712259.1	371	8710	19,7	$1,6 \times 10^{-3}$	glycan synthetase
FRAAL1958	YP_712190.1	13	431	17,4	$4,3 \times 10^{-5}$	short-chain dehydrogenase/reductase
FRAAL3598	YP_713803.1	146	4226	15,7	0,049	LysR family transcriptional regulator
FRAAL2084	YP_712313.1	147	2421	15,1	0,029	Trk system potassium uptake protein
FRAAL3011	YP_713223.1	27	648	13,4	0	LuxR family transcriptional regulator
FRAAL2827	YP_713040.1	1116	15710	11,5	$2,0 \times 10^{-13}$	nonspecific lipid-transfer protein
FRAAL3767	YP_713971.1	396	4398	11,0	0,032	hypothetical protein
FRAAL1613	YP_711857.1	146	1744	10,3	0	hypothetical protein
FRAAL1775	YP_712013.1	26	372	9,8	0	hypothetical protein
FRAAL0349	YP_710637.1	78	744	8,8	$4,2 \times 10^{-3}$	6-methylsalicylic acid synthase
FRAAL3605	YP_713810.1	196	2159	8,3	0	hypothetical protein

FRAAL4807	YP_714991.1	366	3462	7,9	0	ABC transporter ATP-binding protein
FRAAL0882	YP_711146.1	11	93	7,5	$3,0 \times 10^{-7}$	Beta-N-acetylglucosaminidase,
FRAAL1130	YP_711388.1	51	415	7,5	0	acyl carrier protein phosphodiesterase,
FRAAL3948	YP_714148.1	501	5073	7,4	$1,3 \times 10^{-9}$	hypothetical protein
FRAAL2565	YP_712784.1	479	3813	6,9	0,018	polyketide oxygenase/hydroxylase
FRAAL0421	YP_710708.1	511	4583	6,9	0,043	regulatory protein
FRAAL2156	YP_712384.1	843	6087	6,1	0	hypothetical protein
FRAAL3088	YP_713299.1	40	305	5,8	0	hypothetical protein
FRAAL4570	YP_714756.1	106	693	5,7	$2,1 \times 10^{-9}$	hypothetical protein
FRAAL3709	YP_713913.1	227	1315	5,6	$1,7 \times 10^{-8}$	hypothetical protein
FRAAL2023	YP_712254.1	3520	29433	5,3	$1,3 \times 10^{-7}$	hypothetical protein
FRAAL5044	YP_715224.1	1263	6716	5,1	$6,6 \times 10^{-3}$	hypothetical protein
FRAAL0987	YP_711248.1	2606	14412	4,9	$1,1 \times 10^{-3}$	hypothetical protein
FRAAL4908	YP_715091.1	706	3722	4,8	$7,1 \times 10^{-4}$	hypothetical protein
FRAAL4463	YP_714654.1	931	4836	4,1	$3,3 \times 10^{-3}$	isochorismatase
FRAAL3769	YP_713973.1	2456	10355	3,5	$3,5 \times 10^{-10}$	polyprenol-phosphate-mannosyl transferase
FRAAL1138	YP_711395.1	1699	7191	3,4	0	hypothetical protein
FRAAL1345	YP_711595.1	12013	43545	3,0	$9,0 \times 10^{-3}$	hypothetical protein
FRAAL1426	YP_711674.1	28804	83546	2,2	0,029	hypothetical protein
FRAAL4195	YP_714389.1	63982	29860	-2,9	$1,2 \times 10^{-3}$	hypothetical protein
FRAAL3468	YP_713676.1	648	219	-3,7	$3,5 \times 10^{-3}$	alpha-methylacyl-CoA racemase
FRAAL2770	YP_712984.1	14776	4506	-4,5	$2,3 \times 10^{-13}$	hypothetical protein
FRAAL5103	YP_715281.1	16627	3736	-4,6	0,018	hypothetical protein
FRAAL4664	YP_714849.1	415065	88473	-5,7	$1,6 \times 10^{-32}$	hypothetical protein

FRAAL1938	YP_712170.1	279	54	-6,2	$6,7 \times 10^{-7}$	hypothetical protein
FRAAL3844	YP_714046.1	8703	1609	-6,5	$6,6 \times 10^{-3}$	hypothetical protein
FRAAL1739	YP_711978.1	64404	13064	-6,7	$1,4 \times 10^{-5}$	Integrase
FRAAL2430	YP_712650.1	15190	3164	-6,8	$4,3 \times 10^{-7}$	hypothetical protein
FRAAL1989	YP_712221.1	2825	213	-18,3	$5,1 \times 10^{-110}$	hypothetical protein
FRAAL0148	YP_710440.1	12202	640	-25,3	0	hypothetical protein
FRAAL3384	YP_713593.1	386	13	-40,1	$6,90 \times 10^{-141}$	acyl-CoA dehydrogenase,
FRAAL4890	YP_715073.1	666	0	$-\infty$	$6,3 \times 10^{-19}$	transcriptional regulator

¹ Weighted proportions fold change and FDR p-value correction after Baggerley's test on proportions performed with raw counts. FDR P-value <0,05.

potassium serait élevée, l'opéron *kdp* serait réprimé (Epstein, 2003). Ce gène est d'intérêt dans l'étude des hyphes toruleux, car dans le milieu d'induction la concentration de potassium est augmentée de 5x.

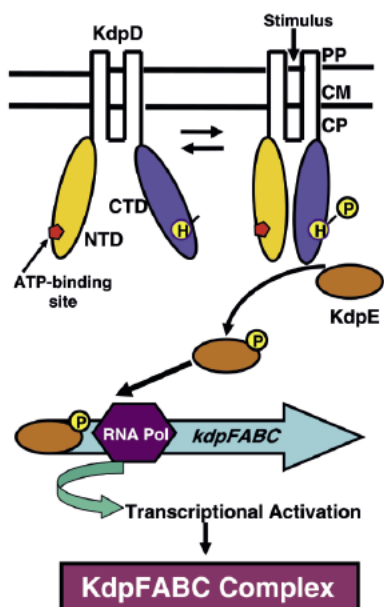


Figure 5 : Régulation de l'opéron *kdpFABC*, tirée de Ballal *et al.* (2007).

1.4.2 FRAAL2084

Le gène FRAAL2084 coderait pour la protéine TrkA. La protéine TrkA est une composante du système *trk*, un transporteur de potassium. Ce système aurait une affinité modérée et une spécificité élevée pour le K^+ (Epstein, 2003). Ce transporteur serait exprimé de façon constitutive. La protéine TrkA serait la composante régulatrice du transporteur Trk (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010). Elle contiendrait 458 résidus et est un bon exemple de la duplication de certains gènes chez les organismes, car FRAAL2085 semblerait coder aussi pour une protéine

TrkA (Epstein, 2003). Les gènes FRAAL2084 et FRAAL2085 sont identiques à 22 % et les deux protéines produites s'assembleraient dans le cytoplasme pour réguler l'entrée de K^+ (figure 6). TrkA posséderait une région similaire aux déshydrogénases et le NADH et NAD pourraient s'y lier (Epstein, 2003). Le gène FRAAL2084 est d'intérêt dans l'étude des hyphes toruleux, car dans le milieu d'induction la concentration de potassium est augmentée de 5x.

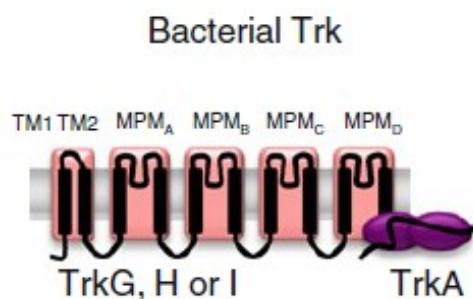


Figure 6 : Schématisation du système trk dans la membrane des bactéries, trkA se retrouve du côté cytoplasmique, tirée de Corratgé-Faillie *et al.* (2010).

1.4.3 *sigH*

sigH coderait pour un facteur sigma alternatif (σ^H). Les bactéries médient habituellement les réponses aux stress avec l'aide de facteurs σ alternatifs (Sevciková *et al.*, 2001). La majorité des gènes codants pour des facteurs σ alternatifs seraient surexprimés lors d'un choc de pH (Kim *et al.*, 2008). Les facteurs σ se lieraient au cœur de l'ARN polymérase pour permettre l'expression de gènes importants dans la réponse au stress. La régulation de ces gènes se ferait avec des antifacteurs sigma qui empêchent la liaison du facteur sigma à l'ARN polymérase (Sevcikova *et al.*, 2010). Chez *Streptomyces coelicolor* A3, σ^H joue un rôle dans la régulation de la réponse au choc osmotique et dans la différenciation morphologique (Sevcikova *et al.*,

2010; Sevciková *et al.*, 2001). Le gène σ^H possède quatre promoteurs différents qui seront plus ou moins utilisés selon les conditions environnementales retrouvées. Les trois facteurs σ^H caractérisés ont des rôles déterminés, le premier est exprimé de façon constitutive, le second est plus actif lors d'un choc osmotique et le troisième est généralement retrouvé lors d'un choc thermique (Sevciková *et al.*, 2001). Ce gène semble important dans la différenciation en hyphes toruleux, car le milieu d'induction comprend une baisse de pH et une plus grande concentration de KH_2PO_4 qui pourraient entraîner un choc osmotique et permettre la régulation des gènes importants dans la différenciation.

1.4.4 FRAAL3700

FRAAL3700 coderait pour un régulateur transcriptionnel. La protéine qui serait formée posséderait un domaine protéique hélice-tour-hélice (HTH) (KEGG, en ligne). Normalement, un domaine HTH serait retrouvé en C-terminal qui se lie à l'ADN et un domaine N-terminal variable qui est responsable de la liaison au ligand et la dimérisation de la protéine régulatrice (Yang *et al.*, 2011; Aravind *et al.*, 2005). Ce gène semble important dans la régulation de l'expression des gènes reliés à la différenciation en hyphes toruleux.

1.4.5 *ileS*

Le gène *ileS* coderait pour une isoleucyl-ARNt synthétase, qui reconnaît spécifiquement l'isoleucine. Il existe une aminoacyl-ARNt synthétase pour chacun des 20 acides aminés essentiels. Les aminoacyl-ARNt synthétases seraient des protéines essentielles pour la traduction et la synthèse protéique (Lee *et al.*, 2004; Salowe *et al.*, 2009; Fournier *et al.*, 2011). Elles seraient responsables de la liaison spécifique des acides aminés aux ARNt, qui est la première étape de la synthèse protéique. La réaction se ferait en deux étapes; (i) la

formation d'un adénylate d'aminoacyl et (ii) le transfert de l'intermédiaire de l'extrémité 3' de l'ARNt vers le site actif du ribosome (Lee *et al.*, 2004). Les aminoacyl-ARNt synthétases seraient d'importance, car les ARNt ne seraient pas en mesure de reconnaître les acides aminés avec lesquels ils seraient couplés, donc c'est cette protéine qui reconnaîtrait les acides aminés et permettrait le bon appariement lors de la synthèse protéique (Lee *et al.*, 2004). Ce gène pourrait être important dans la différenciation en hyphes toruleux via son implication dans la synthèse protéique.

1.4.6 *capD*

Le gène *capD* coderait pour une dTDP-glucose 4,6-déshydratase qui convertit le dTDP-glucose en dTDP-4-céto-6-déoxyglucose (figure 7) (Hegeman *et al.*, 2001; Hegeman *et al.*, 2002). Cette protéine a été pour la première fois identifiée dans la biosynthèse du *L*-rhamnose (Hegeman *et al.*, 2001). Les enzymes 4,6-déshydratases seraient les catalyseurs de la synthèse des 6-déoxycarbohyrates. Les 6-déoxycarbohyrates seraient utilisés par les bactéries pour la production de lipopolysaccharides et dans la biosynthèse de métabolites secondaires comme les antibiotiques (Hegeman *et al.*, 2001). Principalement, les actinomycètes, les myxobactéries et des champignons produisent des métabolites secondaires antibiotiques (Allard *et al.*, 2004). Ils vont utiliser les 6-déoxycarbohyrates pour glycosyler les polycétides, ce qui va augmenter l'efficacité des antibiotiques. Par exemple l'actinomycète, *Streptomyces venezualae* ATCC 15439 produit 2 groupes d'antibiotiques avec chacun 12- ou 14- molécules aromatiques de lactone qui contiennent tous un déoxycarbohydrate désosamine (Allard *et al.*, 2004). Ce gène serait intéressant dans l'étude des hyphes toruleux, car la différenciation cellulaire semble être un métabolisme secondaire.

1.4.7 FRAAL2028

FRAAL2028 coderait pour une glycane synthétase qui posséderait des motifs de glycosyltransférase. Les bactéries produisent plusieurs produits glycosylés, comme le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane, les glycoprotéines, l'acide téichoïque et des exopolysaccharides (Hug et Feldman, 2011). Différentes enzymes seraient d'importance dans la glycosylation, notamment les glycosyltransférases qui utilisent un sucre donneur contenant un groupement phosphate (ex. un nucléoside diphosphate, un nucléoside monophosphate, un phospholipide et un phosphate non substitué) pour y ajouter séquentiellement des monosaccharides (Hug et Feldman, 2011; Lairson *et al.*, 2008).

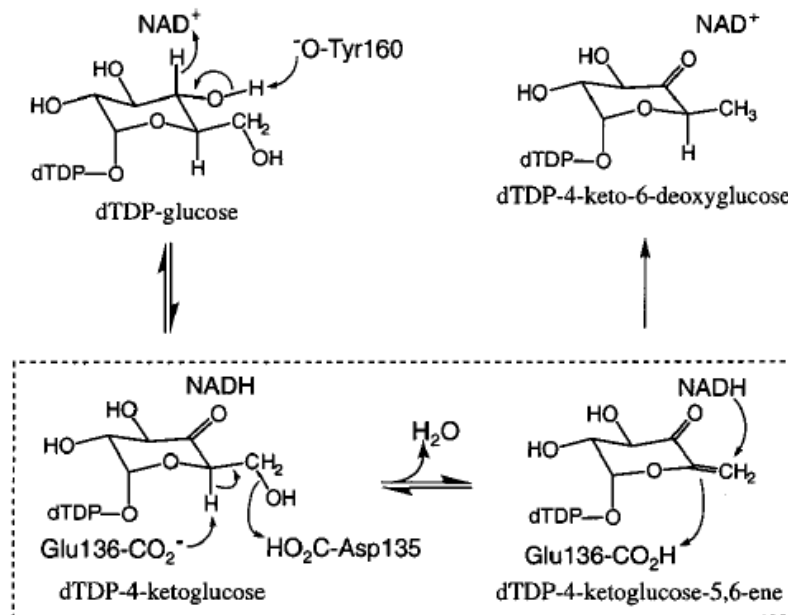


Figure 7 : Schématisation de la conversion du dTDP-glucose en dTDP-4-céto-6-déoxyglucose. La réaction est catalysée par la dTDP-glucose 4,6-déshydratase, tirée de Hegeman et al. (2002).

L'accepteur utilisé par les glycosyltransférases serait souvent un sucre aussi, mais dans certains cas ce serait des lipides, des protéines, des acides nucléiques, des antibiotiques ou d'autres petites molécules (Lairson *et al.*, 2008). L'assemblage de monosaccharides se ferait premièrement par l'attachement d'un résidu de sucre sur une molécule lipidique, l'undécaprényl pyrophosphate. Il y aurait la translocation de la molécule ainsi formée au travers de la membrane plasmique, les sucres pourront être transférés sur des protéines ou des lipides dans la biogenèse de la paroi plasmique (Hug et Feldman, 2011). Ce gène est d'importance, car il serait potentiellement impliqué dans la synthèse de molécules d'intérêt comme les antibiotiques donc lié au métabolisme secondaire.

1.4.8 *thiC*

Ce gène coderait pour une protéine nécessaire à la biosynthèse de la thiamine pyrophosphate (TPP), molécule dérivée de la vitamine B1. ThiC (HMP-P synthase) convertirait un des intermédiaires de la biosynthèse des purines, le 5-aminoimidazole ribotide (AIR), en 4-amino-5-hydroxyméthyl-2-méthylpyrimidine phosphate (HMP-P). Le HMP-P serait couplé avec le 4-méthyl-5-(2-hydroxy-éthyl)-thiazole (THZ-P) pour former la TPP (figure 8) (Palmer *et al.*, 2012). La TPP serait un cofacteur utilisé par les enzymes impliquées dans le métabolisme des carbohydrates, comme la pyruvate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase (Zhang *et al.*, 1997; Taboada *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2012). Le gène *thiC* pourrait être important dans le métabolisme des carbohydrates et lorsque celui-ci est déséquilibré, l'induction du phénotype toruleux pourrait être observée.

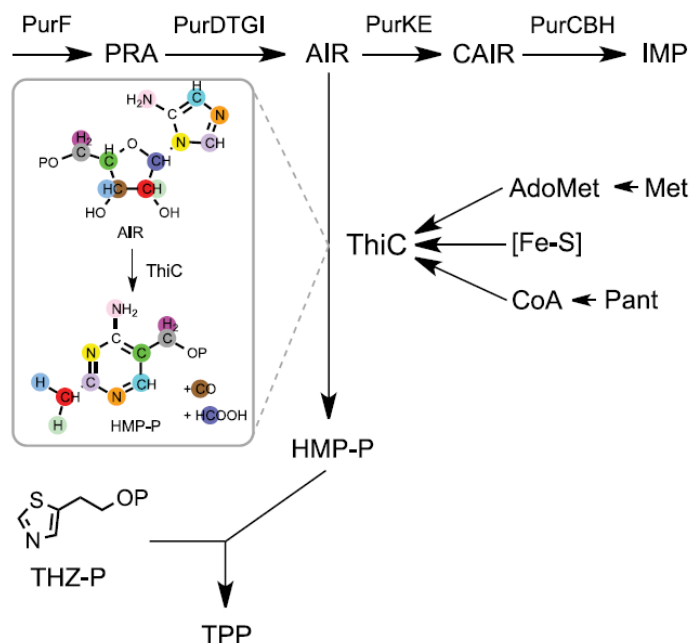


Figure 8 : Catabolisme de la thiamine pyrophosphate (TPP) avec ThiC un cofacteur important dans le métabolisme des carbohydrates, tirée de Palmer et al. (2012).

1.4.9 FRAAL2827

Ce gène coderait pour une protéine non spécifique de transfert de lipide. La protéine posséderait un domaine thiolase en C-terminal (KEGG, en ligne). Les enzymes de la famille des thiolases catalyserait la formation de liens covalents entre deux carbones (C-C) de deux molécules d'esters par la réaction de condensation de Claisen (Haapalainen *et al.*, 2006; Meriläinen *et al.*, 2009; Okamura *et al.*, 2010). Plusieurs voies enzymatiques seraient reliées à cette réaction, la formation d'acides gras, de stéroïdes, de polycétides et la biosynthèse de mévalonate (précurseurs des terpenoïdes) (Haapalainen *et al.*, 2006; Okamura *et al.*, 2010). Lors de la différenciation cellulaire, un épaissement de la membrane plasmique est observé et le gène FRAAL2827 pourrait synthétiser les lipides nécessaires à la formation de la membrane.

1.4.10 *atpD*

Le gène *atpD* coderait pour la sous-unité β de la F_0F_1 ATP synthase. Cette ATP synthase se retrouverait au niveau de la membrane plasmique des bactéries. L'ATP synthase aurait comme fonction le transport de protons et est catalyseur de la synthèse et de l'hydrolyse d'ATP (Al-Shawi *et al.*, 1997). La production d'ATP serait fonction du potentiel électrochimique produit par le gradient de protons se retrouvant de part et d'autre de la membrane. Ce gène serait important pour la balance énergétique cellulaire, il est possible qu'une baisse d'ATP formée induise la différenciation en hyphes toruleux.

1.5 Les hypothèses et objectifs du mémoire

Très peu d'informations sur les hyphes toruleux de *Frankia* sont disponibles dans la littérature. Diem et Dommergues (1985) ont publié la seule étude, jusqu'à tout récemment, traitant sérieusement de ce type cellulaire chez la souche *Frankia* sp. Cj1-82 provenant d'un nodule de *Casuarina junghuhniana*. En 2012, une étude s'intéressait aux hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a, un isolat provenant d'aulne crispé ayant un génome séquencé (Bernèche-D'Amours, 2012). À partir du fait que des hyphes toruleux étaient observés sporadiquement chez *F. alni* ACN14a, un milieu de culture induisant la différenciation massive a été développé. Les différences phénotypiques entre les hyphes toruleux et végétatifs ont été observées en microscopie. De plus, un séquençage de l'ARN a permis de comparer le transcriptome des hyphes végétatifs et toruleux. Mon projet de recherche visait à approfondir les connaissances sur les hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a et comportait deux hypothèses.

Ma première hypothèse était que la modification des conditions culturales permettrait d'augmenter le rendement en hyphes toruleux viables et en déclencher la production chez d'autres souches appartenant au genre *Frankia*. Mes objectifs pour la première hypothèse; 1- identifier la concentration de KH_2PO_4 nécessaire pour induire la différenciation, 2- identifier plus finement le déclencheur de la différenciation, 3- évaluer la capacité de différenciation cellulaire chez d'autres souches de *Frankia*. Ma deuxième hypothèse était que la présence ou le niveau d'expression de certains gènes seraient corrélés avec la différenciation massive en hyphes toruleux. Mes objectifs pour la seconde hypothèse; 1- déterminer la présence des gènes d'intérêt chez les souches de *Frankia* ayant leurs génomes séquencés, 2- évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt par q-PCR. Les résultats du présent mémoire sont divisés en deux chapitres correspondant aux deux hypothèses de recherche. Les résultats des deux chapitres se retrouvent sous la forme manuscrite.

CHAPITRE 1 : AMÉLIORATION DES CONDITIONS CULTURALES POUR L'OBTENTION D'UN MEILLEUR RENDEMENT EN HYPHES TORULEUX VIABLES ET ÉLARGISSEMENT DE LA PRODUCTION À UN PLUS GRAND NOMBRE DE SOUCHES.

1.1 Mise en contexte

L'actinomycète *Frankia* sp. possède différentes morphologies et certaines d'entre elles ont des fonctions cellulaires importantes. En général, la forme la plus souvent observée est les hyphes réguliers, de longs filaments peu septés. On observe aussi la présence de vésicules en particulier lorsqu'il y a une limitation en azote, ce sont des structures spécialisées pour la fixation de l'azote atmosphérique. La bactérie produit une seconde structure spécialisée, les sporangiospores, cette structure contient les spores qui permettent la reproduction et la survie de l'espèce. Diem et Dommergues (1985) ont démontré la présence d'une nouvelle morphologie les « *reproductive torulose hyphae* » (RTH). Cette morphologie consiste en des chaînes de cellules individuelles de forme carrée et bombée. La fonction proposée pour les RTH est la reproduction. Précédemment au laboratoire, un milieu de culture permettant d'obtenir massivement des hyphes toruleux a été élaboré. Ce milieu de culture n'a pas été parfaitement optimisé. La différenciation en hyphes toruleux a été obtenue chez la souche *Frankia alni* ACN14a dans un milieu BAPS (5 g/l de succinate) à une concentration finale de 50 mM de KH_2PO_4 et à un pH de 5,8-5,9. Dans la condition différenciée, il y avait une forte mortalité des hyphes réguliers (environ 60% des hyphes) et 90% des cellules vivantes étaient différenciées en hyphes toruleux. Dans ce chapitre, des essais ont été effectués pour améliorer les conditions de culture et permettre la différenciation en hyphes toruleux chez d'autres souches de *Frankia*, le tout en augmentant les connaissances sur les conditions et la prévalence pour ce type cellulaire.

1.2 Matériels et méthodes

1.2.1 Souches bactériennes utilisées

Plusieurs souches de *Frankia* sp. ont été étudiées dans les essais : *Frankia alni* ACN14a (ULQ010201401), *Frankia* sp. AvcI1 (DDB01020110), ARgP5 (ULQ0132105009), ACN10a (ULQ010201001), ACN13h (aucun # d'attribué), CcI3 (HFP020203) et Cj1-82 (ORS021001). Le nom donné à chacune des souches correspond généralement à un groupe de lettres représentant la plante hôtes (AC pour aulne crispé, ARg pour aulne rugueux), une détermination microscopique de la présence de sporanges dans le nodule (P pour positive et N pour négative). Les chiffres sont une identification arbitraire des échantillons (Normand et Lalonde, 1982). Les différentes souches ont été cultivées en erlenmeyer de 1 l contenant 400 ml de milieu BAPS, décrit par Igual et Dawson (1999), supplémenté de 5 g/l de succinate de sodium. Les cultures sont conservées à 30°C en condition statique à l'obscurité (Bélanger *et al.*, 2011). Les précultures utilisées pour les expérimentations étaient âgées de 2 semaines et avant de les employer, la respiration microbienne a été évaluée avec le réactif constitué du sel 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium et de phézanine méthosulfate (MTS/PMS) (75 µl/ml d'échantillon) avant l'utilisation pour fin d'expériences (Bélanger *et al.*, 2011).

La méthode d'induction de la différenciation en hyphes toruleux développée par Bernèche-D'Amours (2012) consistait à modifier le milieu BAPS pour obtenir une concentration finale de 50 mM de KH_2PO_4 , ce qui correspond à une concentration 5 fois plus grande de KH_2PO_4 que le milieu de base. Les cultures sont incubées à la température de la pièce en condition statique. Le pH du milieu à 50 mM KH_2PO_4 se situe entre 5,8 et 5,9 (Bernèche-D'Amours, 2012). Le milieu de culture estensemencé avec l'équivalent de 5 µg/ml de protéines de *Frankia alni* ACN14a (Bernèche-D'Amours, 2012).

1.2.2 Préparation des inocula

Pour préparer les inocula, les cellules ont été homogénéisées à la seringue avec une aiguille de 18 G½. La concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford pour inoculer les milieux de différenciation de façon reproductible. Les milieux en erlenmeyer étaient ensemencés à 5 µg de protéines/ml et les microplaques l'étaient à une concentration protéique finale de 15 µg/ml. Pour procéder au dosage protéique, un volume de culture avait été placé dans un tube de polypropylène de 2 ml vissés contenant des billes de Zircon Yttrium de 0,6 à 0,8 mm de diamètre (Sigmund Linder, Wasmensteinach, Germany), la lyse cellulaire était effectuée à l'aide du FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Solon, OH) (Bélanger *et al.*, 2011). La méthode de Bradford, un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 595 nm, était utilisée pour déterminer la concentration protéique avec le réactif Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) (Bélanger *et al.*, 2011).

1.2.3 Milieux de culture modifiés

Le milieu BAPS (5 g/l de succinate) a été modifié pour obtenir des concentrations finales de 50 mM de K⁺ en ajoutant du KCl ou 50 mM de PO₄³⁻ en ajoutant du NaH₂PO₄. Le pH des milieux a été ajusté à 6,7 et 5,8-5,9. Ces quatre versions de milieux d'induction ont été ensemencées avec l'équivalent de 5 µg de protéines par ml de *F. alni* ACN14a et incubés à la noirceur à la température pièce de façon statique durant deux semaines.

1.2.4 Criblage en microplaques

Les microplaques 96 puits ont été préparées de la même façon que décrit dans Bélanger *et al.* (2011). Dans une première série d'essais, l'effet de l'ajout de différentes concentrations de KH_2PO_4 était évalué, pour obtenir des concentrations finales entre 0 mM et 60 mM. La méthode d'ajout du KH_2PO_4 a aussi été testée, soit instantanée ou de façon graduelle sur un intervalle de 12 jours. Dans les microplaques, 100 μl de milieu BAPS (5 g/l de succinate) sans KH_2PO_4 avec les constituants 2 fois plus concentrés que les concentrations finales désirées, 50 μl d'inoculum à 60 μg de protéines / ml (ou de la saline 0,85 % NaCl) et 50 μl de la solution de KH_2PO_4 4 fois plus concentrée que la concentration finale désirée (ou de l'eau distillée) étaient ajoutés dans tous les puits. Dans cette série de criblage, différentes souches ont été testées. Une deuxième série a été faite avec l'ajout de 40 mM d'intermédiaires du cycle de Krebs (citrate, *cis*-aconitate, *D*-isocitrate, α -cétoglutarate, succinate, fumarate, malate) dans du milieu BAPS modifié ou non (KH_2PO_4 et KCl) soit à pH 6,7 ou 5,8-5,9. Tous les intermédiaires du cycle de Krebs étaient sous la forme acide sauf le succinate qui est un sel (sodium). Pour limiter l'effet du pH des intermédiaires du cycle de Krebs, le pH des solutions mères des intermédiaires ont été ajusté soit à pH 6,7 ou à 5,8-5,9. Dans les microplaques, 100 μl de milieu BAPS (5 g/l de succinate) (avec tous les constituants 2 fois plus concentrés), 50 μl d'inoculum à 60 μg de protéines / ml (ou de la saline 0,85 % NaCl) et 50 μl de la solution d'intermédiaires du cycle de Krebs 4 fois plus concentrée que la concentration finale désirée (ou de l'eau distillée) étaient ajoutés dans tous les puits. Toutes les microplaques ont été incubées 14 jours à la température de la pièce.

1.2.5 Évaluation de la respiration microbienne par coloration au MTS/PMS

La respiration cellulaire en microplaque a été évaluée quantitativement en ajoutant 15 μl de MTS/PMS dans chacun des puits. La solution de MTS/PMS a été préparée à une concentration

de 2 mg/ml et 0,046 mg/ml respectivement dans la saline 0,85%, comme suggérer par le fournisseur. La solution a été stérilisée par filtration (0,22 µm), conservée à -20°C et protégée de la lumière (Bélanger *et al.*, 2011).

Suite à une incubation de 4 h à 30°C, une lecture de l'absorbance du surnageant à 490 nm a été effectuée avec le lecteur de microplaque Biochrom Asys model UV340 (Biochrom, Cambridge, UK) (Bélanger *et al.*, 2011). Les résultats obtenus ont été relativisés par rapport aux valeurs obtenues dans les puits contenant 10 mM de KH₂PO₄. Les graphiques de respiration microbienne dans différentes conditions ont été créés avec le logiciel GraphPad Prism 6 pour Window (Version 6.02, GraphPad Software Inc, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

1.2.6 Microscopie à épifluorescence

La morphologie et la viabilité des cellules ont été observées par microscopie à épifluorescence à l'aide du colorant *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial viability kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Les hyphes de *Frankia* réguliers et toruleux provenant d'erlenmeyers et de microplaques ont été récoltés, concentrés et mélangés avec le colorant dans un ratio 1 :1. Sur une lame (*Superfrost® Plus*, Fisher scientific company, Ottawa, ON) de microscopie, 20 µl de cellules colorées a été placé sous une lamelle 22x30 (*Fisherfinest™ Premium cover glass*, Fisher scientific company, Ottawa, ON). Les observations sont effectuées à l'aide du microscope inversé à fluorescence d'Olympus 1X70 (Olympus Canada inc., Richmond Hill, ON, Canada). Les photos ont été prises avec la caméra monochrome CoolSNAP-Pro et traités avec le programme Image Pro Plus version 5.1 (*Media Cybernetics*, San Diego, CA).

1.2.7 Microscopie électronique à transmission

Les hyphes réguliers et toruleux provenant de cultures en erlenmeyer ont été récoltés et centrifugés dans des microtubes de 1,5 ml pour obtenir un culot de 5 mm de profond. La fixation primaire des culots de cellules a été faite avec une solution tampon 0,1 M de cacodylate de sodium pH 7,4 contenant 2 % de glutaraldéhyde, 4 % de paraformaldéhyde et 0,2 % d'acide tannique pendant 15 min. La solution fixatrice a été enlevée et 20 µl d'albumine 15 % a été ajouté pour être par la suite échangé pour de la solution de fixation fraîche et incubée 2 h. Les cellules ont été lavées 3 fois avec le tampon 0,1 M cacodylate pH 7,4. La fixation secondaire consistait à ajouter une solution tampon de 0,1 M cacodylate pH 7,4 contenant 1,5 % de tétr oxyde d'osmium au culot durant 4 h. Durant cette incubation, les culots ont été coupés en morceaux de 1 mm³. Les culots de cellules ont été rincés trois fois avec le tampon 0,1 M cacodylate pH 7,4 et trois fois avec de l'eau. La fixation tertiaire a été faite dans une solution d'acétate d'uranyle 2 % pendant 3 h. Les culots ont été lavés trois fois dans l'eau avant de subir une déshydratation graduelle (15 min.) dans chacune des solutions d'éthanol suivantes; 50 %, 70 %, 80 %, 90 % et 100 %. Les cellules fixées ont été passées dans l'oxyde de propylène puis ont été enrobées de façon graduelle dans la résine Épon 812 à 60°C. Des sections de 1 µm ont été colorées au bleu de toluidine et ont été examinées en microscopie optique pour déterminer les blocs qui contenaient une densité cellulaire intéressante. Les blocs d'intérêt ont été coupés en sections de 70 nm d'épaisseur à l'aide d'un ultramicrotome, placés sur une grille de cuivre et colorés à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Les grilles ont été observées avec le microscope électronique à transmission H-7500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japon) (Bernèche-D'Amours, 2012).

1.2.8 Dosage des constituants cellulaires et du milieu (protéines, ADN, phosphate, biomarqueurs, sources de carbone)

Des cultures d'hyphes réguliers et toruleux provenant d'*erlenmeyers* ont été comparées sur la base de dosages de macromolécules comme les protéines, l'ADN double brin (db), le PO_4^{3-} , les sources de carbone et différents marqueurs cellulaires à chaque semaine durant 2 mois. De plus, le pH a été suivi tout au long des prises de données (pH mètre Accumet Basic AB15 #13-636-AB15, micro-électrode Accumet #13-620-96, Fisher Scientific, Ottawa, ON).

Les protéines ont été dosées par la méthode décrite dans la section 1.2.1 lors de la préparation d'inoculum. Les échantillons qui ont été lysés par la méthode des billes pour le dosage protéique ont aussi été utilisés pour doser l'ADN db avec la trousse *Quant-it™ dsDNA Assay High Sensitivity Kit (Molecular probes®)*, Burlington, ON). Les instructions de la compagnie ont été suivies. Les échantillons ont été placés dans des microplaques de 96 puits noirs (*Thermo Scientific*, Waltham, MA) et la fluorescence a été lue par le lecteur de microplaques Tecan safire 2™ (*Tecan group Ltd.*, Männedorf, Switzerland) réglé à des longueurs d'onde de 510 nm d'excitation et 527 nm d'émission (Bernèche-D'Amours, 2012).

Des échantillons de 150 µl de culture non lavés et non homogénéisés ont été placés en triplicata dans une microplaque 96 puits noirs pour le dosage des biomarqueurs. La microplaque a été lue dans le lecteur de microplaques Tecan safire 2™ (*Tecan group Ltd.*, Männedorf, Switzerland) à l'aide du programme Magellan™ - *Data Analysis Software* (version 6, *Tecan group Ltd.*, Männedorf, Switzerland). Seize combinaisons de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission permettaient de mesurer différents constituants cellulaires (tableau 2). Les valeurs obtenues sont des unités de fluorescence relative.

Le phosphate a été dosé en prélevant 1 ml de culture et a été dilué ou non pour que les résultats se retrouvent dans la limite fiable de l'essai. Au prélèvement, 1 ml d'acide sulfurique 5 N et 1 ml d'ammonium molybdate 2,5 % ont été ajoutés et l'échantillon est mélangé. À la réaction, 100 µl de solution réductrice contenant 0,025 g/ml d'un mélange de produit (0,2 g de 4-Amino-3-hydroxy-1-naphtalenesulfonique acide et 1,2 g de métabisulfite de sodium) a été ajouté. Le volume réactionnel a été complété à 10 ml avec 6,9 ml d'eau distillée et a été bien mélangé. Les tubes ont été incubés 10 minutes à température pièce. La densité optique à 660 nm a été prise et comparée avec une courbe d'étalonnage de KH_2PO_4 pour déterminer la quantité de PO_4^{3-} présent dans l'échantillon.

Pour connaître la consommation des sources de carbones (succinate et propionate) dans les différentes conditions de culture, les échantillons sont suivis à l'aide du HPLC (Varian Prostart UV-VIS *detector model 320*, *Varian inc./Agilent technologies Canada inc.*, Mississauga, ON). Les échantillons ont été filtrés à 0,22 µm et un volume de 1,5 ml a été placé dans des vials. Le HPLC contient une colonne échangeuse d'ions spécialement conçue pour la séparation d'acides organiques et d'alcools (PRP-X300 7 µm 4,1 x 250 mm, *Hamilton company*, Reno, NV). La phase mobile pour le HPLC était un solvant qui contient 92 % d'acide sulfurique 1,5 mN et 8 % d'acétonitrile pur avec un débit de 0,5 ml/min. Les échantillons ont été injectés dans le HPLC et les résultats d'aires sous la courbe obtenus sont exprimés en mVolt·sec avec le programme *Star chromatography Workstation* (version 5.31, *Varian inc./Agilent technologies Canada inc.*, Mississauga, ON). Une courbe d'étalonnage pour chaque source de carbone analysée (succinate, propionate) a été faite pour déterminer la concentration retrouvée dans les échantillons.

Tableau 2 : Valeurs des longueurs d'onde utilisées pour chacun des biomarqueurs potentiels (Sirois *et al.*, 2012).

Longueurs d'onde (nm)		Biomarqueurs potentiels
Excitation	Émission	
230	352	Tryptamine
263	334	Phénylalanine / Histidine
263	397	Pyridoxine
275	349	Tryptamine
275	358	Tryptophane
275	448	NADH
275	530	Riboflavine / FAD
300	400	ATP
232	394	Pyridoxine
350	445	NADH
356	598	Sanguinarine
360	465	Autofluorescence
368	526	Riboflavine
368	532	FAD
431	535	FAD
452	532	Riboflavine / FAD

1.3 Résultats

1.3.1 Évaluation la capacité de différenciation de souches de *Frankia* avec ajout temporel ou instantané de l'agent inducteur

En premier lieu, l'essai a été effectué avec la souche *Frankia alni* ACN14a, une souche connue pour se différencier en hyphes toruleux (Bernèche-D'Amours, 2012). L'effet de différentes concentrations finales de KH_2PO_4 (0 mM à 60 mM) dans le milieu BAPS a été observé pour déterminer la concentration permettant d'obtenir massivement des hyphes toruleux. Par la suite, différentes souches de *Frankia* sp. ont été testées dans les mêmes conditions (AvcI1, ACN10a, ACN13h, ARgP5, Cj1-82, CcI3) (figure 9).

Seulement la souche ACN14a a permis l'obtention d'hyphes toruleux de façon massive. À partir d'une concentration finale de 40 mM les cellules vivantes restantes étaient toutes différenciées. La souche ACN10a a démontré tout de même une particularité intéressante, elle produit de gros sporanges à partir d'une concentration finale de 25 mM de KH_2PO_4 et à cette concentration, seuls les sporanges survivent (figure 9C et 10B). Les souches AvcI1, ACN13h, Cj1-82 et ARgP5 produisent des sporanges sans toutefois subir de mort cellulaire particulière ni se différencier en hyphes toruleux.

La respiration cellulaire totale a été déterminée à l'aide des valeurs d'absorbances obtenues suite à la réduction du MTS/PMS (figure 9). La souche *F. alni* ACN14a subissait une augmentation de respiration plus la concentration en KH_2PO_4 augmentait jusqu'à un certain point critique (une concentration de 30 mM). À ce point, il y a une forte mortalité cellulaire et la respiration diminue brusquement. C'est à ce moment aussi que la différenciation massive a lieu (figure 9A). *Frankia* sp. ACN10a alcalinise le milieu tout comme *F. alni* ACN14a et subit

une chute de respiration au même moment où l'alcalinisation n'a plus lieu, mais à des concentrations plus faibles de KH_2PO_4 . Seulement les sporanges survivent à une concentration finale de 25 mM de KH_2PO_4 chez *F. alni* ACN10a (figure 10).

Pour les autres souches, l'ajout de KH_2PO_4 ne semblait affecter ni la croissance ni la respiration cellulaire. Le pH a été pris aux différentes concentrations, ce qui a permis d'observer une augmentation du pH lors de la croissance bactérienne de *F. alni* ACN14a et de *Frankia* sp. ACN10a (figure 9 A-D). La respiration cellulaire chute au même moment que l'augmentation de la mortalité cellulaire et de la diminution du pH chez *F. alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a. Des observations microscopiques avec le colorant *LIVE/DEAD*® ont été effectuées pour déterminer qualitativement la présence et la proportion d'hyphes toruleux présents dans les différentes conditions (tableau 3).

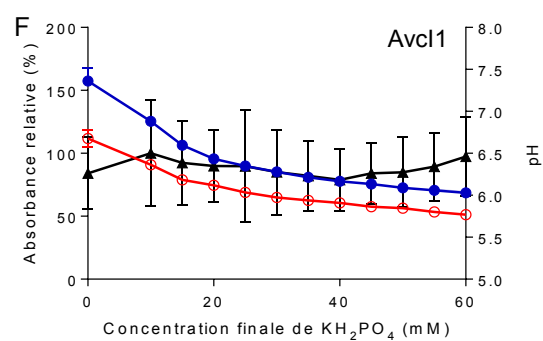
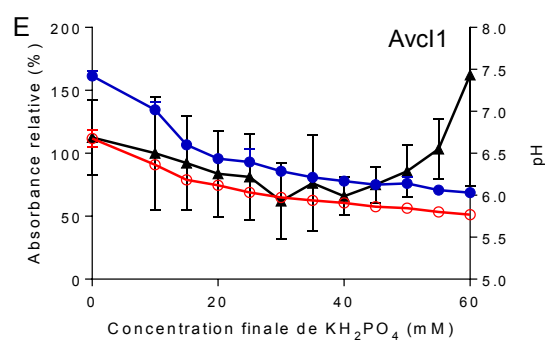
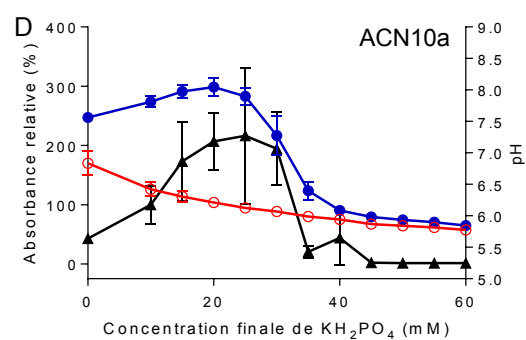
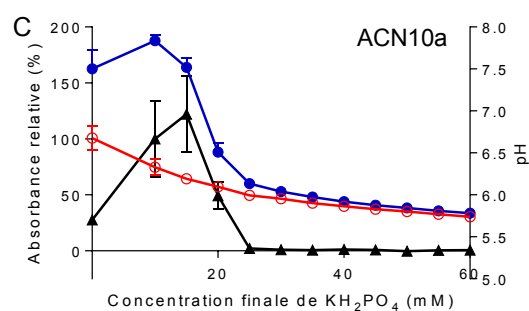
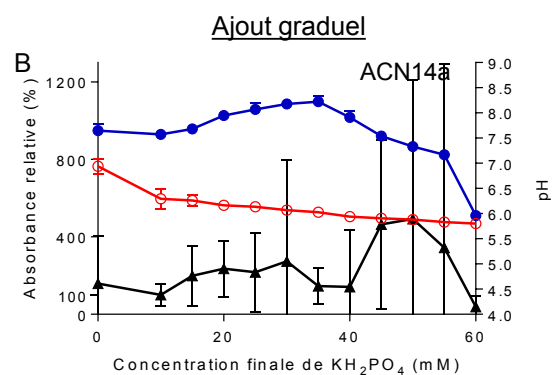
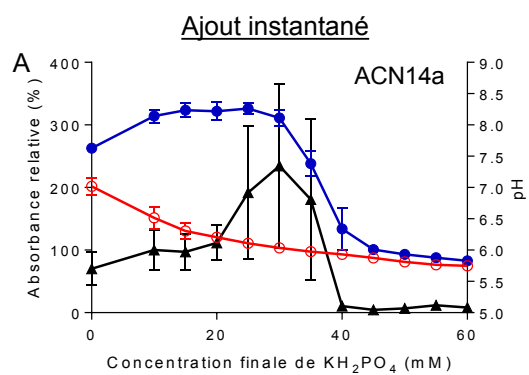
Tableau 3 : Effet de la concentration finale en KH_2PO_4 sur la différenciation en hyphes toruleux chez les différentes souches de *Frankia*.

KH_2PO_4 (mM)	Souches de <i>Frankia</i>						
	ACN14a	AvcI1	ACN10a	ARgP5	ACN13h	Cj1-82	CcI3
0	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-
30	±	-	-	-	-	-	-
35	±	-	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-	-
55	+	-	-	-	-	-	-
60	+	-	-	-	-	-	-

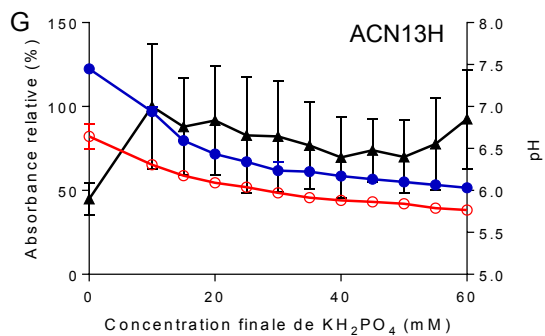
- : Absence d'hyphes toruleux

± : Présence d'hyphes toruleux pas de façon massive (les hyphes vivants ne sont pas tous différenciés)

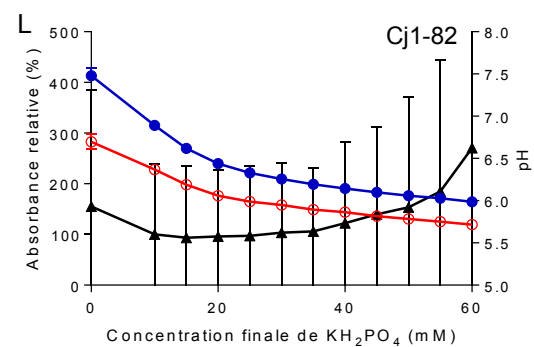
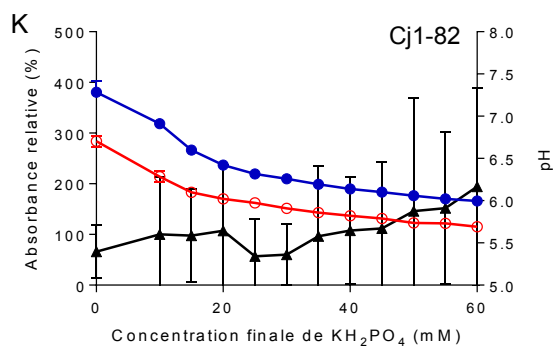
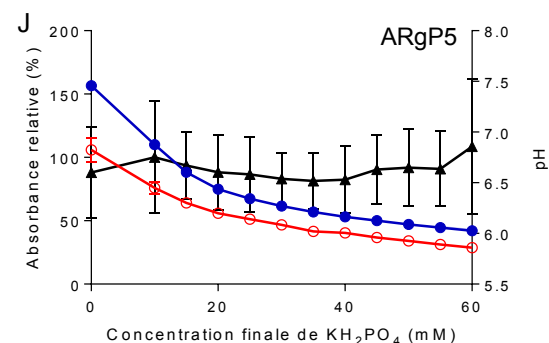
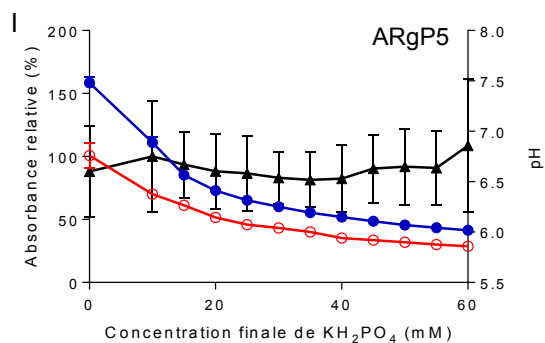
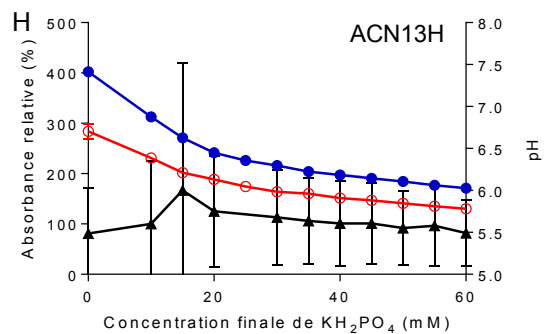
+



Ajout instantané



Ajout graduel



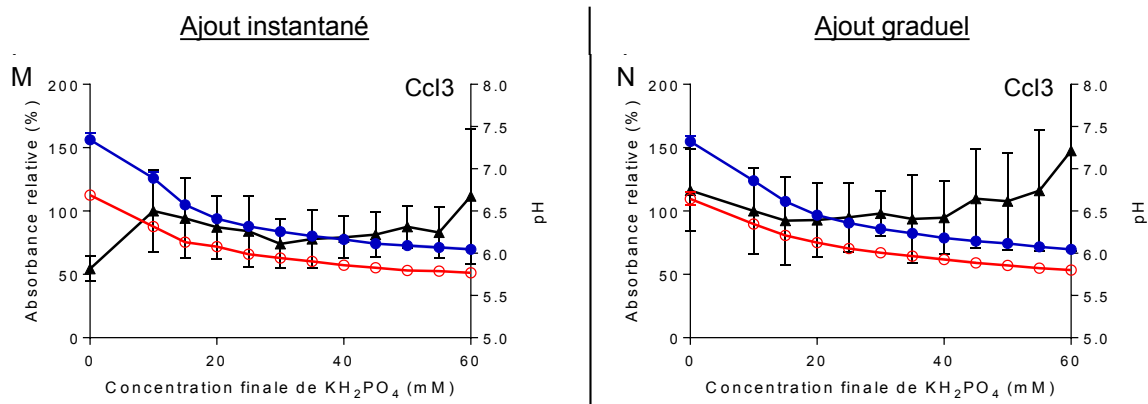


Figure 9 : Respiration cellulaire déterminée à l'aide du MTS-PMS et de la spectrophotométrie à 490 nm à différentes concentrations de KH_2PO_4 chez 7 souches de *Frankia*; (A) *F. alni* ACN14a ajout instantané, (B) *F. alni* ACN14a ajouts graduels, (C) *Frankia sp.* ACN10a ajout instantané, (D) *Frankia sp.* ACN10a ajouts graduels, (E) *Frankia sp.* AvcI1 ajout instantané, (F) *Frankia sp.* AvcI1 ajouts graduels, (G) *Frankia sp.* ACN13H ajout instantané, (H) *Frankia sp.* ACN13H ajouts graduels, (I) *Frankia sp.* ARgP5 ajout instantané, (J) *Frankia sp.* ARgP5 ajouts graduels, (K) *Frankia sp.* Cj1-82 ajout instantané, (L) *Frankia sp.* Cj1-82 ajouts graduels, (M) *Frankia sp.* Ccl3 ajout instantané et (N) *Frankia sp.* Ccl3 ajouts graduels. Le pH des puits non-inoculés est représenté par (○), le pH des puits inoculés par (●) et la respiration cellulaire via le dosage du MTS par (▲).

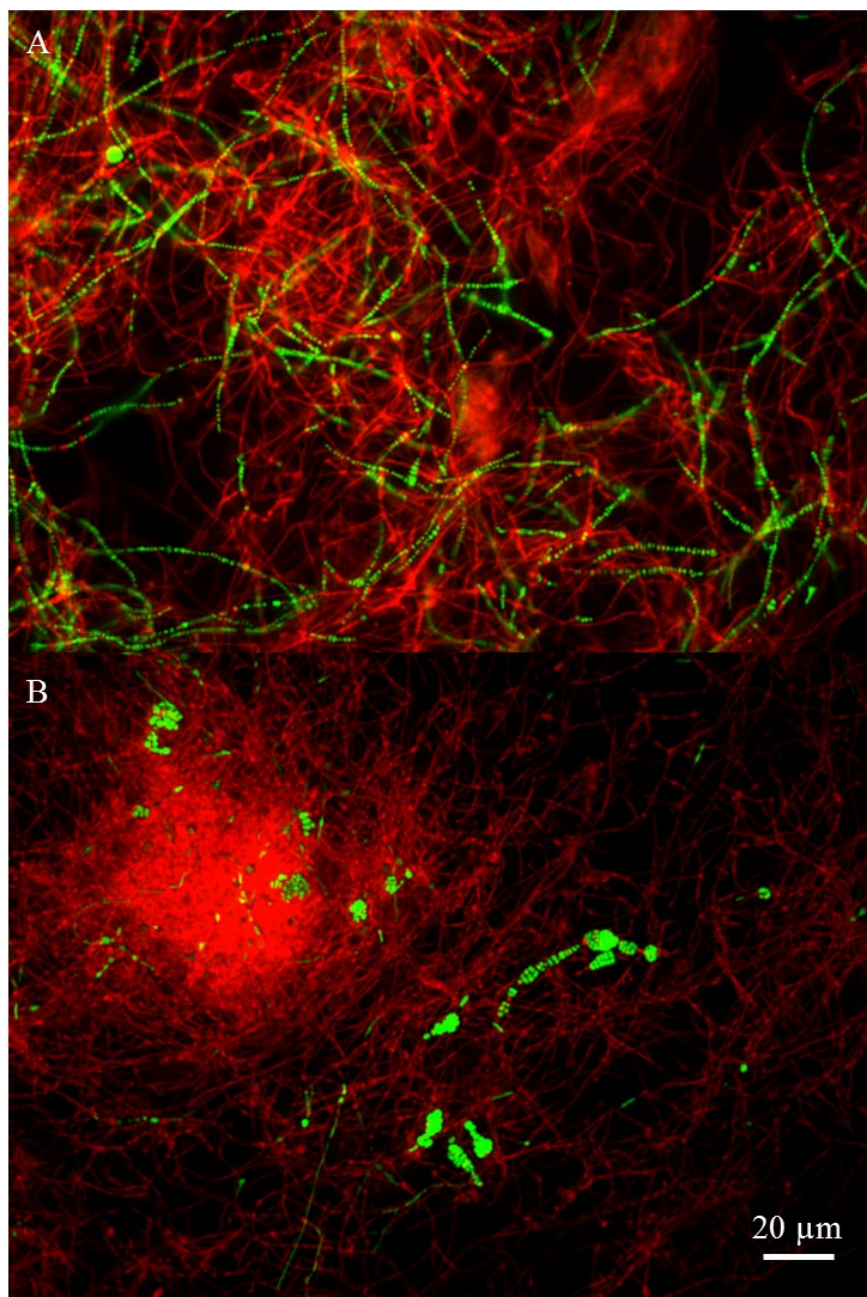


Figure 10 : Morphologie cellulaire observée à la concentration de KH_2PO_4 permettant une différenciation. Les cellules sont colorées avec le produit *LIVE/DEAD*®. (A) *F. alni* ACN14a à une concentration finale de 50 mM de KH_2PO_4 , (B) *Frankia* sp. ACN10a à une concentration finale de 25 mM de KH_2PO_4 . Observation effectuée après 2 semaines d'incubation à température pièce avec un grossissement de 600X.

1.3.2 Détermination du stimulus impliqué dans la différenciation en hyphes toruleux

La condition connue de différenciation avec *Frankia alni* ACN14a consiste en l'ajout de KH_2PO_4 , une molécule se dissociant en K^+ , PO_4^{3-} et H^+ . La diminution de pH à 5,8-5,9 est causée par les H^+ ajoutés et il a été observé que cet abaissement est essentiel pour la différenciation en hyphes toruleux (Bernèche-D'Amours, 2012). Des milieux BAPS (5 g/l succinate) modifiés contenant 40 mM KCl ou de 40 mM de NaH_2PO_4 ont permis de déterminer si la différenciation en hyphes toruleux est causée par le potassium ou le phosphate. Dans ces milieux la concentration finale de K^+ ou de PO_4^{3-} sont de 50 mM tout comme le milieu à 50 mM KH_2PO_4 . J'ai obtenu massivement des hyphes toruleux seulement dans la condition supplémentée avec du KCl à pH 5,8-5,9. La différenciation en hyphes toruleux, lors de l'ajout de KCl, semble très similaire à la condition avec le KH_2PO_4 (figure 11). Toutefois, le NaH_2PO_4 n'induit aucune différenciation cellulaire.

De manière à vérifier la similarité des cellules obtenues avec l'ajout de KH_2PO_4 et celles avec l'ajout de KCl à un pH de 5,8-5,9, de la microscopie électronique à transmission a été effectuée (figure 12). La figure 12, illustre que les cellules différenciées, autant avec le KH_2PO_4 que le KCl, sont beaucoup plus septées que les cellules en BAPS normal. De plus, nous notons un épaissement significatif de la paroi cellulaire (figure 13).

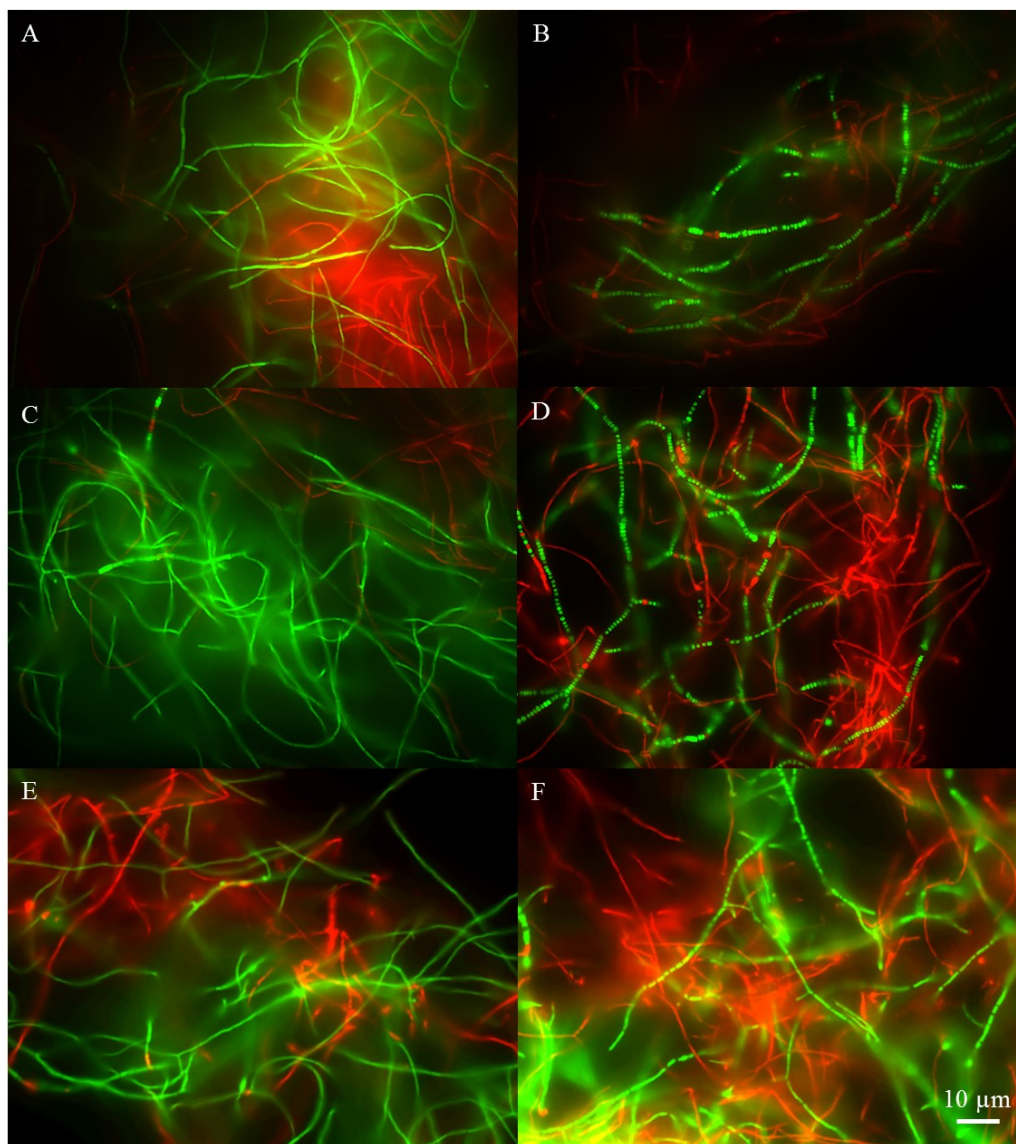


Figure 11 : Détermination de l'importance du potassium et du phosphate indépendamment dans la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a. (A) milieu BAPS pH 6,7, (B) milieu BAPS à une concentration finale de 50 mM KH_2PO_4 pH 5,8-5,9, (C) milieu BAPS à une concentration finale de 40 mM KCl pH 6,7, (D) milieu BAPS à une concentration finale de 40 mM KCl pH 5,8-5,9, (E) milieu BAPS à une concentration finale de 40 mM NaH_2PO_4 pH 6,7, (F) milieu BAPS à une concentration finale de 40 mM NaH_2PO_4 pH 5,8-5,9. Observation effectuée après 2 semaines d'incubation à température pièce. Les cellules sont colorées avec le *LIVE/DEAD*® avec un grossissement de 1000X.

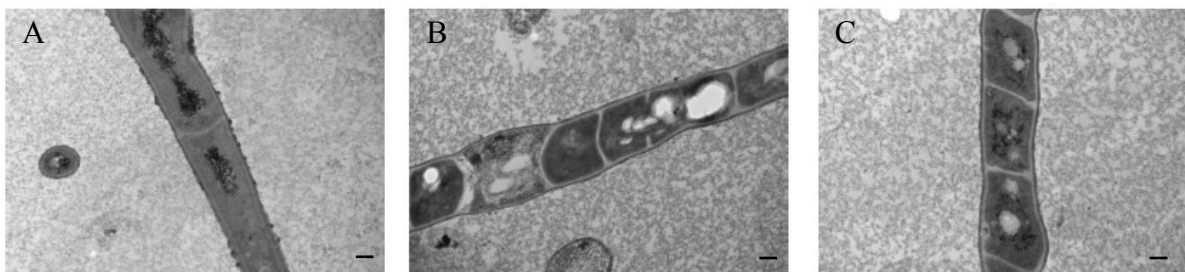


Figure 12 : Observation de l'état cellulaire de *Frankia alni* ACN14a en MET dans différentes conditions de culture. (A) BAPS pH 6,7, (B) BAPS 50 mM KH_2PO_4 pH 5,8-5,9, (C) BAPS 40 mM KCl pH 5,8-5,9. Grossissement de 12000X, la barre d'échelle représente 200 nm.

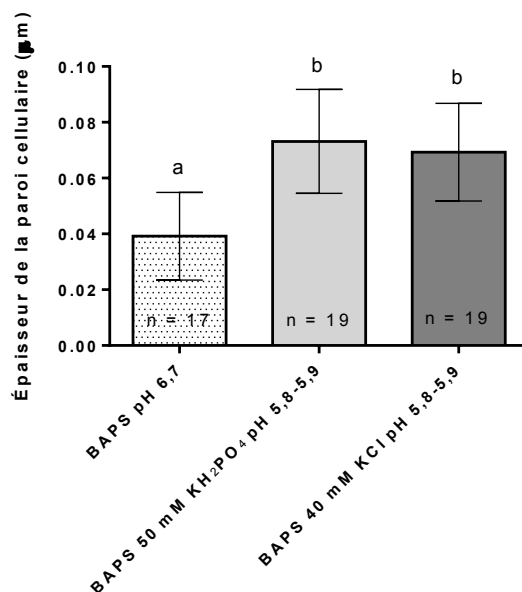


Figure 13 : Détermination de l'épaisseur des parois cellulaires de *Frankia alni* ACN14a dans différentes conditions de culture à partir des images obtenues par MET à un grossissement de 5000X. Les lettres identiques signifient qu'il n'y a pas de différences significatives tandis que des lettres différentes indiquent une différence significative (ANOVA suivi d'un test de Tukey, significatif à $p < 0,05$). n signifie le nombre de mesures d'épaisseur des parois.

1.3.3 Intermédiaires du cycle de Krebs

Pour déterminer si le cycle de Krebs joue un rôle dans la différenciation cellulaire en hyphes toruleux, différents intermédiaires du cycle de Krebs (citrate, *cis*-aconitate, *D*-isocitrate, α -cétooglutarate, succinate, fumarate, malate) ont été ajoutés dans les milieux de culture (figure 14). L'ajout de ceux-ci dans le milieu BAPS à pH 6,7 (supplémenté de KH_2PO_4 ou KCl) ne permet en aucun cas une différenciation massive en hyphes toruleux (figure 15). Par contre, dans les milieux supplémentés (concentration finale de 50 mM de KH_2PO_4 ou 40 mM KCl) à pH de 5,8-5,9, l'ajout de certains intermédiaires, comme le citrate, le *cis*-aconitate, l' α -cétooglutarate et le fumarate inhibe la différenciation en hyphes toruleux. Ces observations ont été faites par microscopie à épifluorescence (*LIVE/DEAD*®) et corroborent les résultats des évaluations de respiration cellulaire (coloration MTS) montrés à la figure 15.

Dans le milieu supplémenté en KCl à pH 5,8-5,9, le *D*-isocitrate inhibe également la différenciation. Il importe toutefois de mentionner que la mortalité cellulaire demeure élevée dans ces différents milieux en comparaison avec les milieux à pH 6,7 (figure 15).

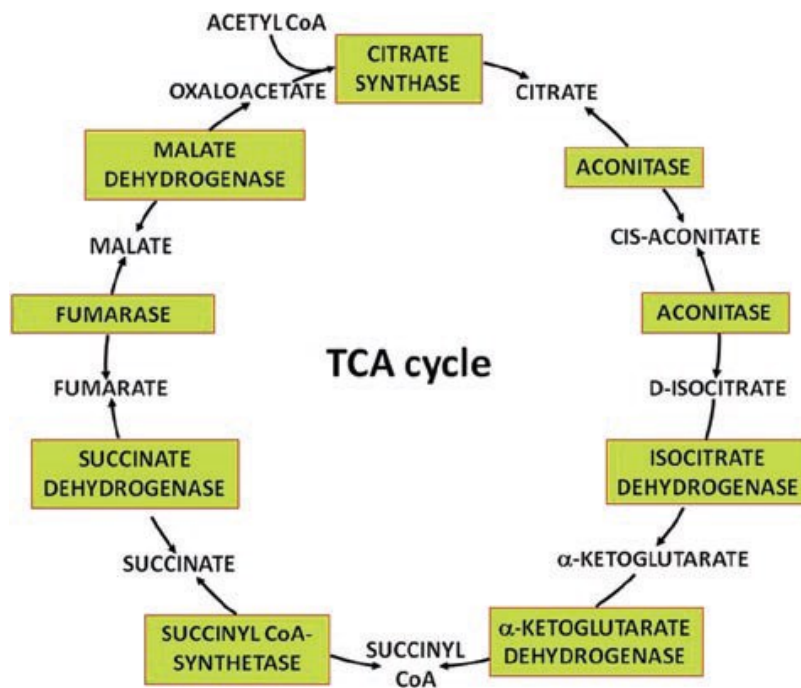
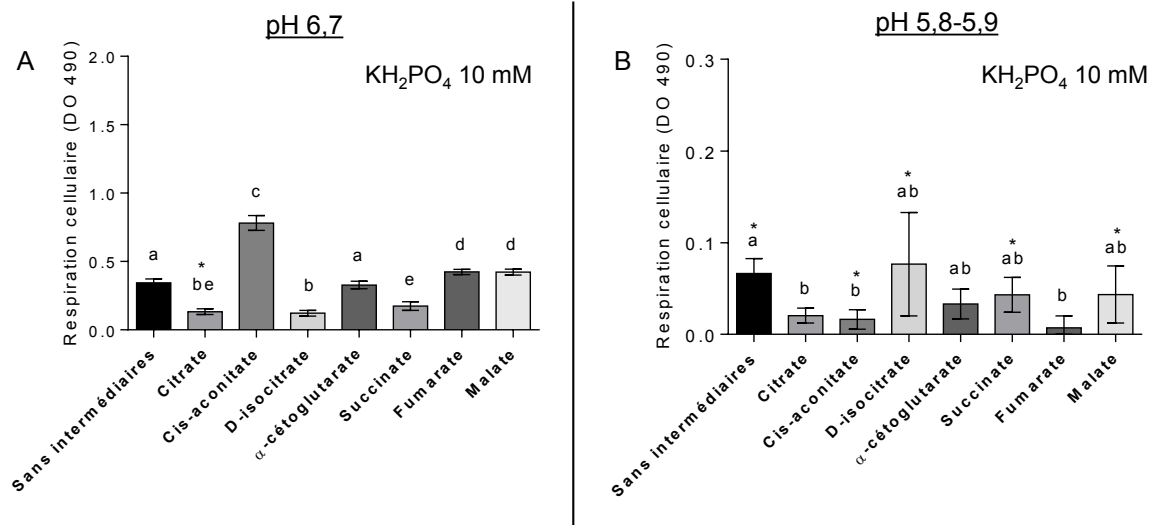


Figure 14 : Schématisation du cycle de Krebs, tirée de Gaster *et al.* (2012).



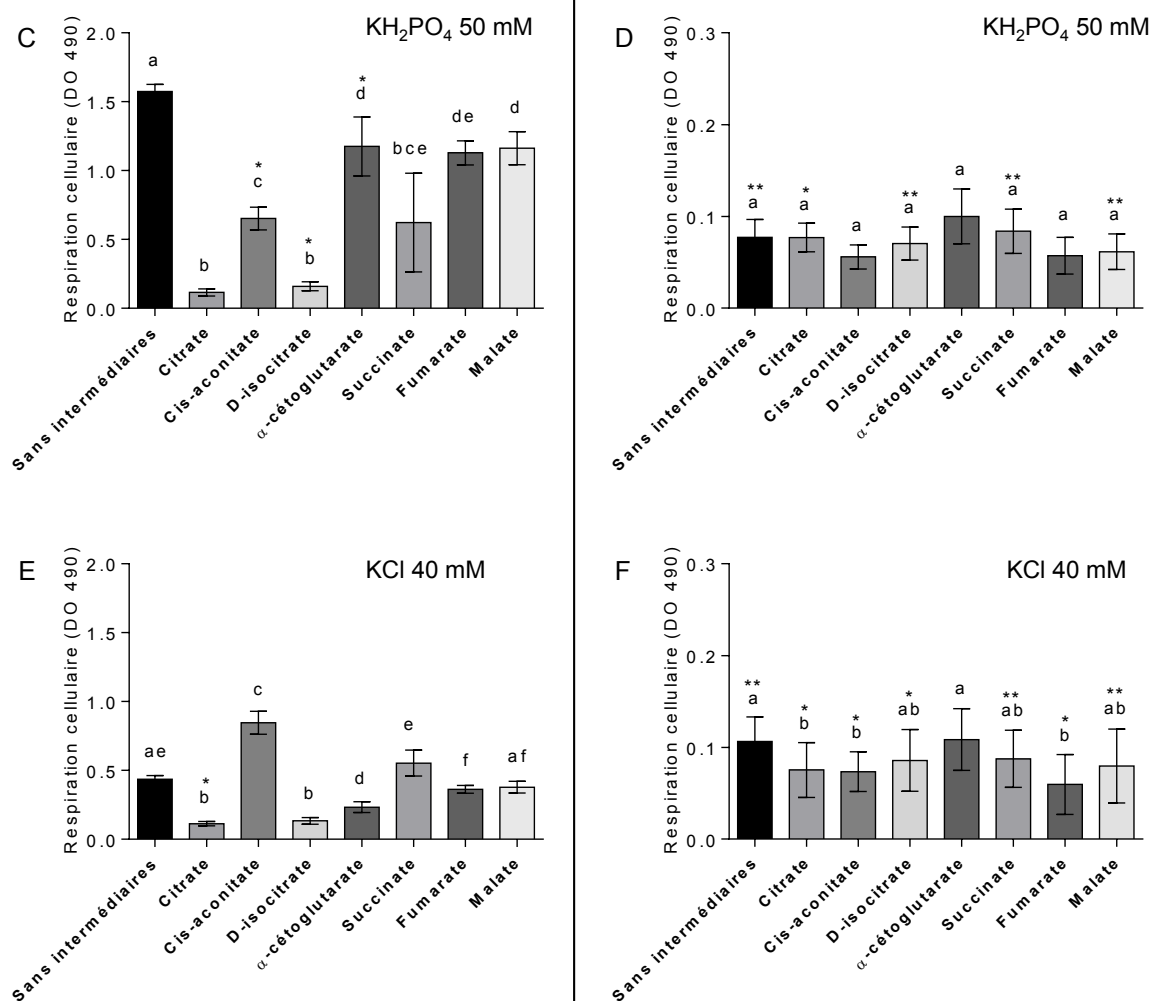


Figure 15 : Respiration cellulaire déterminée à l'aide du MTS-PMS et de la spectrophotométrie à 490 nm de différents intermédiaires du cycle de Krebs chez *Frankia alni* ACN14a. (A) milieu BAPS pH 6,7, (B) milieu BAPS pH 5,8-5,9, (C) milieu BAPS 50 mM KH_2PO_4 pH 6,7, (D) milieu BAPS 50 mM KH_2PO_4 pH 5,8-5,9, (E) milieu BAPS 40 mM KCl pH 6,7 et (F) milieu BAPS 40 mM KCl pH 5,8-5,9. Les lettres identiques signifient qu'il n'y a pas de différences significatives dans la respiration cellulaire selon les ajouts d'intermédiaires du cycle de Krebs tandis que des lettres différentes indiquent une différence significative (ANOVA une voie (tests multiples) suivie d'un test de Tukey, significatif à p value < 0,05). Une étoile (*) signifie qu'il y avait présence d'hyphes toruleux et deux étoiles (**) signifie une différenciation massive en hyphes toruleux.

1.3.4 Détermination de l'effet d'une limitation en azote exogène sur la différenciation

Le milieu BAPS a été modifié pour induire la formation de vésicules, en omettant le NH_4Cl . Dans un milieu ne contenant pas de NH_4Cl pH 6,7, le taux de mortalité augmente et les hyphes vivants sont non différenciés en hyphes toruleux. Dans cette condition, on observe des vésicules situées sur de courts embranchements d'hyphes (figure 16A). La combinaison d'une limitation en azote et l'ajout de 50 mM de KH_2PO_4 induit une prolifération de vésicules, mais pas d'hyphes toruleux. De plus, les acides nucléiques ne semblaient pas distribués de façon uniforme dans les hyphes (figure 16B).

En appliquant de façon séquentielle les stress, il était possible de voir si l'un ou l'autre avait un impact sur soit la production de vésicules ou la différenciation en hyphes toruleux. En faisant une première incubation de deux semaines dans le milieu BAPS sans azote pour ensuite transférer les cellules dans un milieu BAPS sans azote contenant 50 mM de KH_2PO_4 , on pouvait observer des vésicules, mais pas d'hyphes toruleux (figure 16C). La mortalité des hyphes augmentait et les acides nucléiques n'étaient pas uniformément distribués dans les hyphes comme la figure 16B. Une seconde combinaison, qui consistait en une première incubation dans un milieu contenant 50 mM de KH_2PO_4 pour par la suite transférer les cellules dans un milieu BAPS sans azote contenant 50 mM de KH_2PO_4 , a permis d'obtenir des hyphes toruleux, des hyphes normaux avec un contenu cellulaire irrégulier et des vésicules.

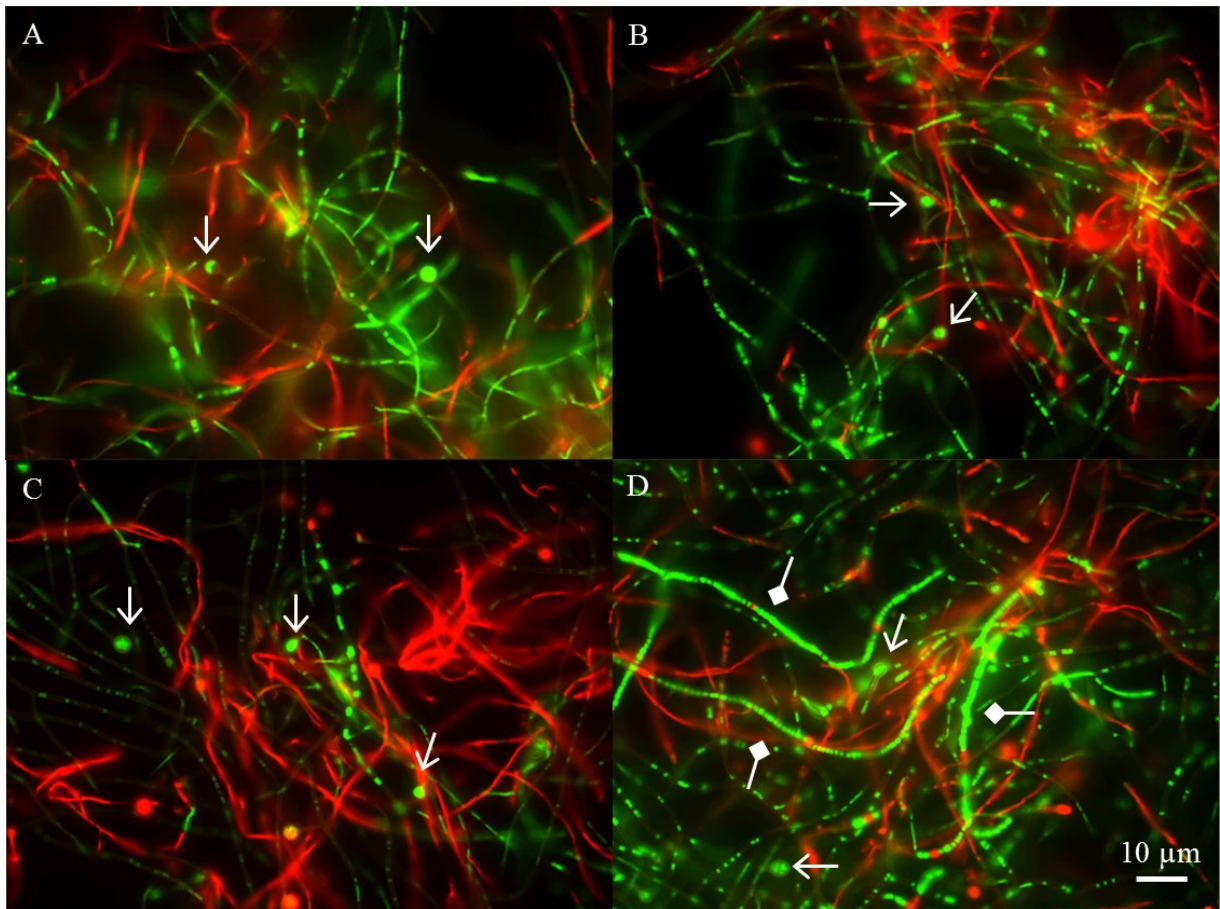


Figure 16 : Effet de la prolifération de vésicules sur la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a. (A) BAPS sans NH_4Cl pH 6,7 incubé 2 semaines, (B) BAPS sans NH_4Cl 50 mM KH_2PO_4 pH 5,8-5,9 incubé 2 semaines, (C) BAPS sans NH_4Cl pH 6,7 incubé 2 semaines et transférés dans du BAPS sans NH_4Cl 50 mM KH_2PO_4 pH 5,8-5,9 incubé 2 semaines, (D) BAPS 50 mM KH_2PO_4 pH 5,8-5,9 incubé 2 semaines et transférés dans du BAPS sans azote 50 mM KH_2PO_4 incubé 2 semaines. Les flèches pointent les vésicules et les losanges pointent les cellules différenciées en RTH. Observé avec un grossissement de 1000X.

1.3.5 Évaluation de l'état cellulaire de *Frankia* différenciée dans le temps

Lors de la différenciation de *Frankia alni* ACN14a en hyphes toruleux, le métabolisme bactérien est modifié. Ces changements ont été évalués quantitativement en effectuant divers dosages. La quantité de protéines, d'ADN db et le pH augmentent très tranquillement dans les cultures d'hyphes toruleux, tandis qu'il y a une augmentation rapide de ceux-ci dans les conditions normales de croissance (figure 17).

La concentration de PO_4^{3-} semble demeurer stable autant dans les conditions normales que celles de différenciation (figure 17). *F. alni* ACN14a consomme préférentiellement le propionate au succinate et les hyphes toruleux ont un métabolisme ralenti qui permet qu'une faible consommation de propionate au fil du temps (figure 17). Les résultats obtenus pour les biomarqueurs permettent aussi d'observer une légère augmentation de la fluorescence émise au fil des jours pour les hyphes toruleux tandis que pour les hyphes normaux l'augmentation de la fluorescence émise est beaucoup plus marquée, sauf en B (figure 18).

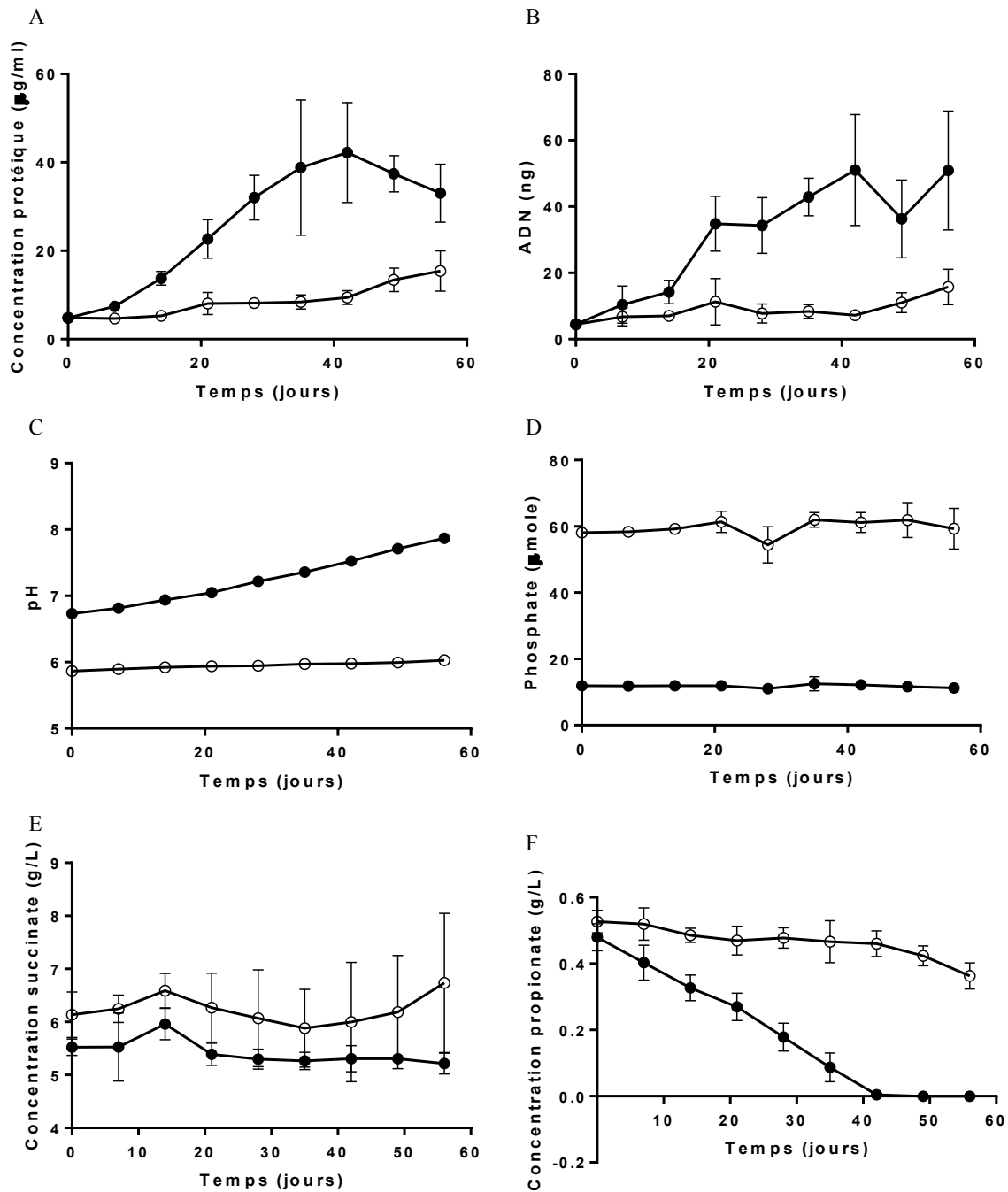
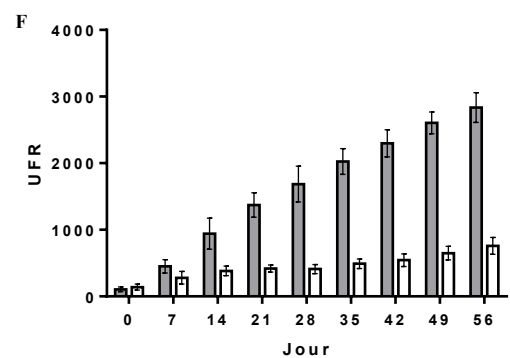
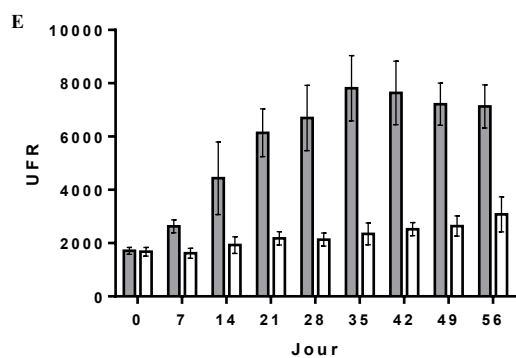
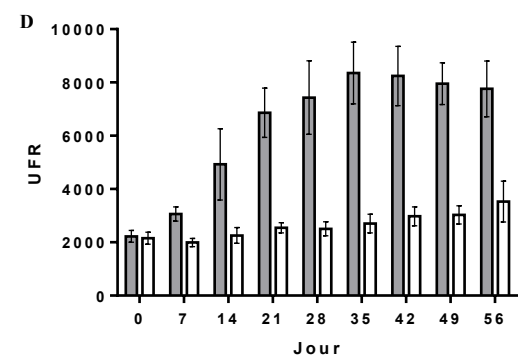
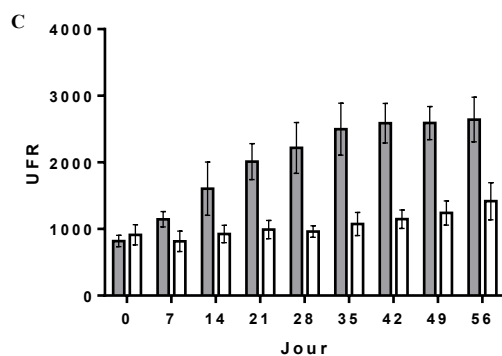
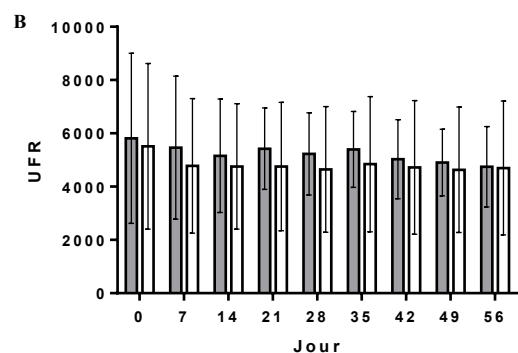
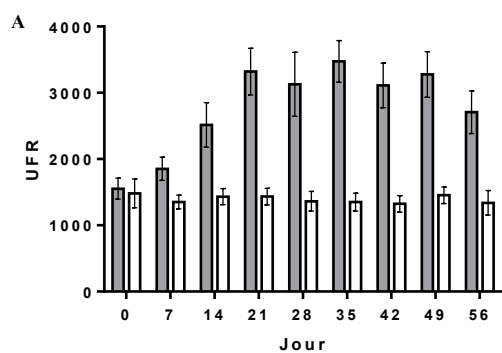
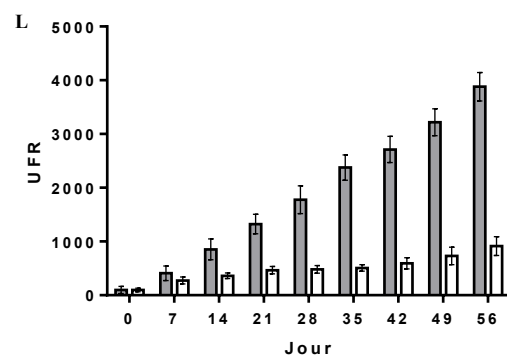
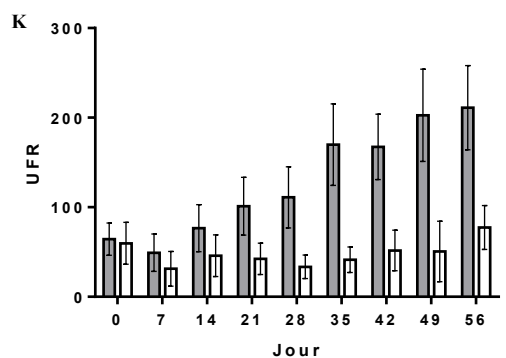
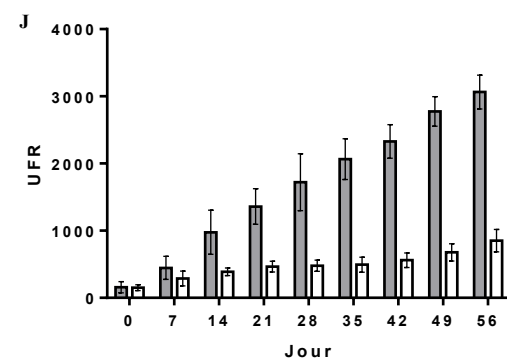
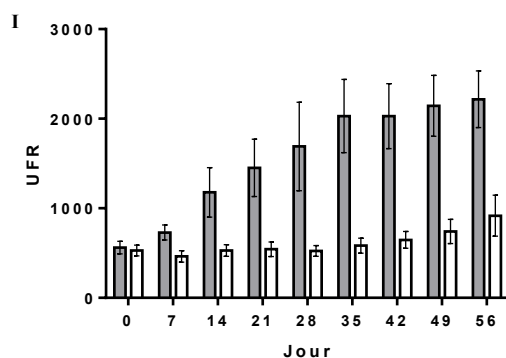
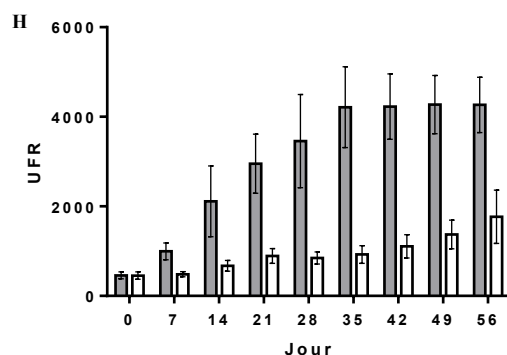
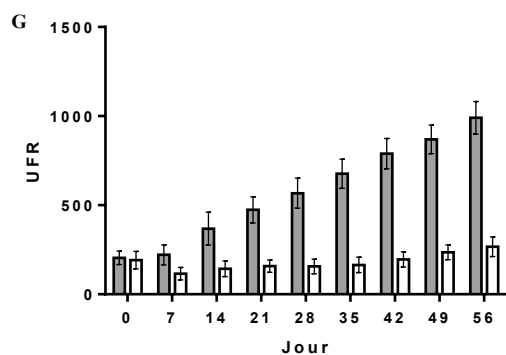


Figure 17 : Suivis de cultures de BAPS pH 6,7 et du BAPS 50 mM KH_2PO_4 pH 5,8-5,9. (A) la concentration protéique, (B) la quantité d'ADN db, (C) le pH, (D) la quantité de phosphate, (E) la concentration de succinate et (F) la concentration de propionate. Les (●) correspondent à aux hyphes réguliers et les (○) correspondent aux hyphes toruleux.





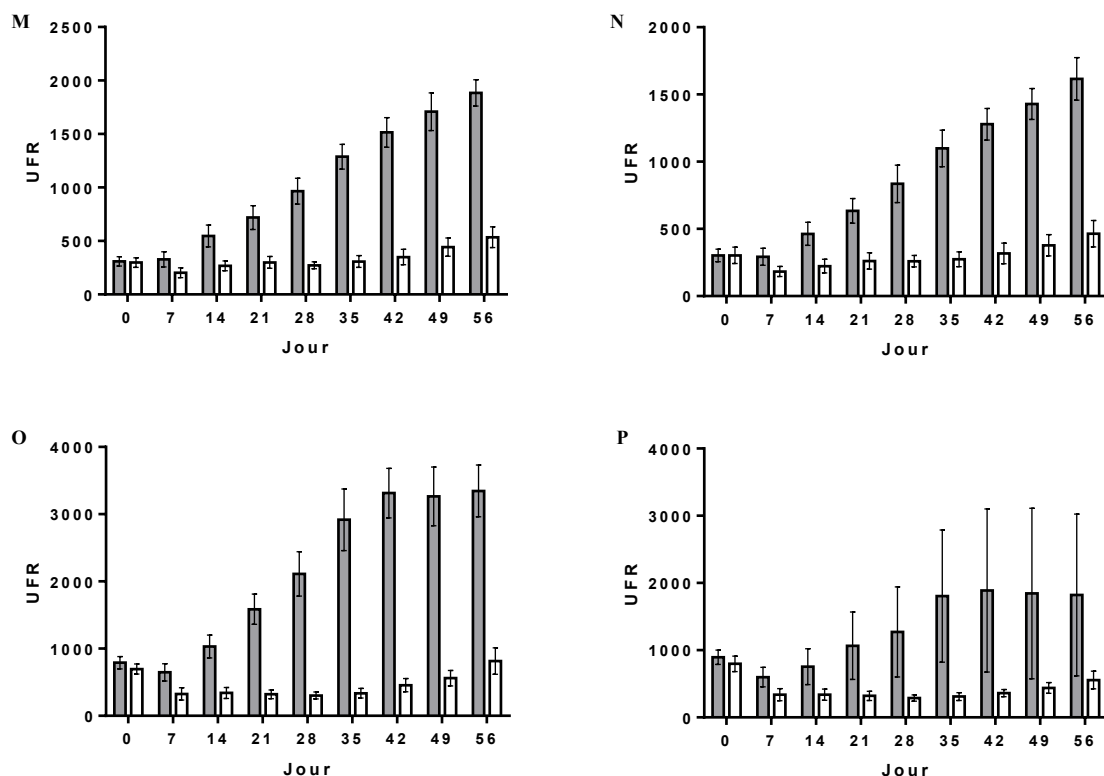


Figure 18 : Dosage fluorimétrique des biomarqueurs sur des cultures de *Frankia alni* ACN14a en hyphes végétatifs (gris) ou en hyphes toruleux (blanc). ($\lambda_{\text{excitation}}$, $\lambda_{\text{émission}}$ en nm) (A) tryptamine (230, 352), (B) phénylalanine et histidine (263, 334), (C) pyridoxine (263, 397), (D) tryptamine (275, 349), (E) tryptophane (275, 358), (F) NADH (275, 448), (G) riboflavine et FAD (275, 530), (H) ATP (300, 400), (I) pyridoxine (323, 394), (J) NADH (350, 345), (K) sanguinarine (356, 598), (L) autofluorescence (360, 465), (M) riboflavine (368, 526), (N) FAD (368, 532), (O) FAD (431, 535) et (P) riboflavine et FAD (452, 532). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.

CHAPITRE 2 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION EN HYPHES TORULEUX.

2.1 Mise en contexte

Suite à l'obtention de cultures ayant une différenciation massive en hyphes toruleux, Bernèche-D'Amours (2012) a comparé l'expression des gènes dans les conditions normales de croissance et de différenciation. Une analyse transcriptomique a été effectuée par le séquençage d'ARN, puis une liste de 77 gènes d'intérêt a été dressée (Bernèche-D'Amours, 2012). Dans la présente étude, dix gènes ont été étudiés de façon plus spécifique à l'aide du q-PCR. L'expression des gènes d'échantillons d'ARN de *F. alni* ACN14a, différenciés ou non, ayant été extrait de culture à 8 et 14 jours, a premièrement été déterminée. À partir de la 8^e journée, la différenciation en hyphes toruleux est perceptible et au jour 14 tous les hyphes viables sont différenciés. Ensuite, un suivi plus rapproché dans le temps a été effectué ce qui a permis l'évaluation de l'expression des gènes tous les 2 jours jusqu'à 14 jours en plus d'une prise de donnée au jour 28.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Alignements des génomes séquencés

La présence de gènes d'intérêt (section 1.4) pour la différenciation en hyphes toruleux a été vérifiée chez les quatre souches de *Frankia* (autre que *F. alni* ACN14a) ayant des génomes complètement connus jusqu'à présent (*Frankia* sp. CcI3, EAN1pec, EUI1c et le symbionte de

Datisca glomerata). Le programme de bio-informatique *CLC Main Workbench* version 6.0 a été utilisé pour les analyses de génomes.

2.2.2 Extraction d'ARN

Des prélèvements de 50 ml de cultures de *Frankia alni* ACN14a en hyphes réguliers ou en hyphes toruleux ont été centrifugés à 3435 x g pendant 10 minutes à 4°C. Un traitement du culot bactérien avec le produit *Bacterial RNA protect* (QIAGEN Inc., Toronto, ON) a été fait pour limiter la dégradation de l'ARN et l'altération des transcrits. L'ARN total a été extrait à l'aide de la trousse *RNeasy plant mini kit* (QIAGEN Inc., Toronto, ON) en suivant les instructions de la compagnie pour les cellules végétales et les champignons filamenteux avec quelques modifications. Les culots ont été plongés dans l'azote liquide pour soit être conservés à -80°C ou être broyés avec un mortier. Les broyats ont été suspendus dans 450 µl de tampon RLT (*RNeasy plant mini kit*, QIAGEN Inc., Toronto, ON) contenant 1% polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Les suspensions ont été transférées dans des tubes de polypropylène de 2 ml vissés (Sarstedt, Montréal, QC) contenant 150 mg de billes Zircon-Yttrium de 0,6 à 0,8 mm de diamètre (Sigmund Linder, Wasmensteinach, Germany) placé 4 h dans un four à plus de 240°C pour inactiver les RNases. Les cellules ont subi quatre traitements à 6,5 m·s⁻¹ de 15 s avec l'appareil *FastPrep®-24* (MP Biomedicals, Solon, OH) avec une mise sur glace de 2 minutes entre chacun des traitements. Une digestion sur colonne de DNases a été effectuée avec la trousse *RNase-free DNase set* (QIAGEN Inc., Toronto, ON). Une seconde digestion de DNases a été faite avec la trousse *Turbo DNA-free Kit* (Ambion, Burlington, On) pour empêcher les contaminations d'ADN dans les extraits. Une purification a été effectuée avec la trousse *RNeasy mini kit* en suivant le protocole RNA clean-up. La concentration et la pureté des extraits d'ARN ont été analysées par spectrophotométrie avec le Nanodrop (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE). L'intégrité des extraits d'ARN a été vérifiée à l'aide du *Bioanalyzer 2100* d'Agilent avec les puces Agilent RNA 6000 Nano Kit (*Agilent Technologies*, Inc., Wilmington, DE) en mode *Eukaryote total RNA Nano*

(Bernèche-D'Amours, 2012). Cette analyse permet de voir le profil virtuel d'une électrophorèse, d'obtenir la concentration en acides nucléiques et d'obtenir la valeur de l'intégrité (RIN) qui consiste en une échelle allant de 1 à 10, 10 étant la valeur la plus intègre.

2.2.3 ADNc

La transcription inverse de l'ARN extrait a été faite à l'aide du produit *IScript Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad, Mississauga, ON) qui contient l'enzyme transcriptase inverse (RT), des inhibiteurs d'ARNases, des dNTPs, des amorces, du chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et des stabilisateurs. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 20 μ l. La réaction a été effectuée dans un thermocycleur S1000™ (Bio-Rad, Mississauga, ON) programmé pour effectuer un cycle de chacune des trois étapes suivantes : (i) 5 minutes d'hybridation à 25°C, (ii) 30 minutes de transcription inverse à 42°C et (iii) 5 minutes d'inactivation de la RT à 85°C. La trousse de Bio-Rad inclue un mélange réactionnel NoRT, qui contient tous les réactifs sauf l'enzyme, pour les contrôles négatifs.

2.2.4 PCR quantitative

La réaction de q-PCR a été effectuée pour mesurer l'augmentation de transcrits via la fluorescence émise par le produit *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (Bio-Rad, Mississauga, ON) dans l'appareil *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf Canada, Mississauga, ON). Les échantillons étaient placés dans des microplaques pour les PCR (PCR-96-LP-FLT-C, Axygen inc, Union city, CA) recouvertes d'une pellicule adhésive (UC-500, *Platamax Ultraclear Sealing Film*, Axygen inc, Union city, CA). Les couples d'amorces (*IDT Technology*, Coralville, IA) pour amplifier les 10 gènes sélectionnés dans la liste exhaustive ont été choisis pour amplifier des fragments entre 70 et 140 pb (tableau 4). Une mise au point de la technique

de q-PCR devait être effectuée avant de procéder à l'évaluation de l'expression relative des 10 gènes sélectionnés. L'échantillon d'ADNc employé pour la mise au point était un mélange des trois réplicats provenant d'hyphes normaux et des trois réplicats provenant d'hyphes toruleux amalgamé ensemble. Une première réaction de q-PCR en gradient de température (54 à 66°C) a été effectuée pour déterminer la température optimale de chaque couple d'amorces (la température d'hybridation recherchée était de 60°C). Les étapes du programme q-PCR consistaient à : (i) une dénaturation initiale à 95°C pour 3 minutes (1 cycle), (ii) la dénaturation à 95°C pour 10 secondes suivies de l'hybridation/élongation avec un gradient de 54 à 66°C pour 30 secondes (40 cycles), (iii) la courbe de fusion consistait à 95°C pour 15 secondes, 60°C pour 15 secondes, une augmentation progressive de 60°C à 95°C sur 20 minutes et 95°C pour 15 secondes (1 cycle). Une vérification des produits PCR obtenus, a été accomplie dans un gel 2% agarose à 75 volts 90 minutes pour s'assurer de la spécificité des amorces utilisées. Par la suite, une réaction de q-PCR a été effectuée avec un programme similaire, sauf qu'à l'étape (ii) l'hybridation/élongation était faite à 60°C. L'ADNc pour cette réaction subissait 8 dilutions sériées ayant des facteurs de dilution variant entre 3 et 4. Les valeurs des cycles seuils (Ct) recueillies par l'appareil ont été utilisées pour faire une courbe standard. La courbe obtenue devait avoir au moins 4 points dans la courbe, un R^2 plus grand que 0,98, une efficacité se situant entre 90-110%. L'efficacité est calculée comme suit : $10^{1/\text{pente}} * 100$. Seuls les couples d'amorces donnant des courbes standards valables ont été conservés pour la suite (tableau 4).

De la même méthode, les couples d'amorces des gènes de référence *gyrA*, *gyrB*, *rpoD* et *dnaG* ont été testés (tableau 4). Le programme *NormFinder Excel Add-In* (version 0.953, MOMA Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Denmark) a permis de sélectionner les meilleurs candidats comme gène de référence; *gyrB* et *dnaG*. La moyenne géométrique des deux gènes de référence ($\sqrt{Ct\ gyrB * Ct\ dnaG}$) a été utilisée pour relativiser les résultats d'expression des différents gènes (Vandesompele *et al.*, 2002). Les ADNc des hyphes réguliers et toruleux ont été dilués pour être dans les limites fiables des courbes standards obtenues précédemment pour chacun des couples d'amorces. Le ratio d'expression

des gènes entre les hyphes réguliers et les hyphes toruleux a été calculé via la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ en suivant cette formule : $2^{-((CT_{\text{gène}} - CT_{\text{gène de référence}})_{\text{toruleux}} - (CT_{\text{gène}} - CT_{\text{gène de référence}})_{\text{réguliers}})}$, cette formule tient compte la normalisation par rapport à un gène de référence. L'expérience a été effectuée avec trois réplicats biologiques et avec, au minimum, des duplicatas techniques.

Tableau 4 : Les oligonucléotides utilisés pour les essais de q-PCR.

Gènes	Amorces	Séquences	Fragment (pb)
<i>gyrB</i>	GYRB-F1433	5'-TCCTGAAGAACACCGAGGTCCA-3'	97
	GYRB-R1529	5'-ACGATCTTGTGATAGCGCAGCTTG-3'	
<i>dnaG</i>	DNAG-F1864	5'-CGTTTCGTCACCGCTCTC-3'	85
	DNAG-R1948	5'-CGCGTGACATCTGTTCGT-3'	
<i>kdpC</i>	KDPC-F866-2	5'-TTGAGGCCGAGCACGTT-3'	70
	KDPC-R797	5'-TGCGGGATCACACGA-3'	
<i>capD</i>	CAPD-F444	5'-GTGGCGACTGGTGGAGGA-3'	137
	CAPD-R580	5'-CGGGGTAATAGGGGCTGT-3'	
<i>thiC</i>	THIC-F4	5'-TCGCCATTCAACCGTGATGTGT-3'	116
	THIC-R115	5'-AAACACTCGGGATTTCCACCGA-3'	
<i>sigH</i>	SIGH-F770	5'-TCCTGCGCTTCTTCGGCAACAT-3'	76
	SIGH-R845	5'-CGGGACACGTGCATCTGGGATATT-3'	
<i>ileS</i>	ILES-F1921	5'-TGCCGACGTGCTTGCTCATCTT-3'	121
	ILES-R1801	5'-TGGTTCTACACCCTGATGGCGA-3'	
<i>atpD</i>	ATPD-F826	5'-GGGTGAACCGGAAGATGT-3'	137
	ATPD-R690	5'-GGTGTTCGGCCAGATGGA-3'	
FRAAL3700	FRAAL3700-F428	5'-GGGGTGGCGTTGTTCGAGT-3'	118
	FRAAL3700-R311	5'-AGATGATCCTGCACGCGGT-3'	
FRAAL2028	FRAAL2028-F832	5'-CGGGCACTCCCATCATCC-3'	80
	FRAAL2028-R753	5'-GTGCGACGCCATCTTCTT-3'	
FRAAL2084	FRAAL2084-F310	5'-ACAGCCACTCGTTCTTGG-3'	132
	FRAAL2084-R179	5'-ACGAATGCACCGTCCTG-3'	
FRAAL2827	FRAAL2827-F904	5'-GACGAGTACTTCGCCTCCAG-3'	113
	FRAAL2827-R1016	5'-GGCGAGAAGTGGTCGTAGAG-3'	

2.3 Résultats

2.3.1 Alignement des génomes séquencés

L'analyse bio-informatique effectuée à l'aide du programme *CLC Main Workbench* version 6.0 a permis de faire les alignements des gènes différemment exprimés lors de la différenciation en hyphes toruleux de *F. alni* ACN14a sur les génomes séquencés de *Frankia* sp. (CcI3, EAN1pec, EUI1c et le symbionte de *D. glomerata*). Dans le tableau 5, plusieurs gènes étaient présents exclusivement chez *F. alni* ACN14a (45 sur 77 gènes, 58 %) et les gènes présents chez d'autres souches ont des homologies de séquence entre 80-100%. Par contre, la taille des fragments homologues est parfois plus courte chez les autres souches, perdant dans certains cas la moitié de la longueur du gène.

2.3.2 Mise au point de la technique de q-PCR et premières analyses de q-PCR

Les extraits d'ARN de culture (réguliers et toruleux) transcrits en ADNc ont été utilisés pour faire la mise au point de la technique de q-PCR. Les premiers essais de q-PCR ont été effectués avec les ADNc provenant de cultures de 8 et 14 jours, à partir de 8 jours la différenciation est perceptible et à 14 jours la différenciation semble complète en microscopie. Le *Bioanalyzer 2100* d'Agilent permet de vérifier l'intégrité de l'ARN. Le tableau 6 représente les différentes valeurs de RIN et concentrations d'ARN obtenus pour chaque extraction d'ARN effectuée. Les échantillons provenant d'hyphes végétatifs sont de meilleures qualités que les extraits provenant d'hyphes toruleux.

Pour chacun des gènes étudiés, un couple d'amorces permettant d'obtenir une amplification efficace sans produits secondaires et possèdent une température d'hybridation près de 60°C par q-PCR devait être trouvé, donc plusieurs couples ont été testés (annexe 1). Les amorces choisies pour la suite se retrouvent dans le tableau 4. Une identification des meilleurs gènes de références entre *gyrA*, *gyrB*, *dnaG* et *rpoD* a été effectuée à l'aide du programme *NormFinder Excel Add-In*. Le meilleur gène de référence selon le programme était *gyrB*. Le programme permet aussi de cibler la meilleure combinaison de gènes de référence qui était *gyrB* et *gyrA*. Toutefois, *gyrB* et *gyrA* sont des gènes qui se suivent dans le génome de *F. alni* ACN14a et ils sont potentiellement régulés par le même promoteur. Pour cette raison, la combinaison *gyrB* et *dnaG* a été choisie pour l'analyse des résultats de q-PCR.

Tableau 5 : Gènes différemment exprimés chez les hyphes toruleux et végétatifs de la souche *Frankia alni* ACN14a et leur présence chez les autres souches de *Frankia* séquencées.

Gène	GenBank	Fragment (nt)	Facteur de variation	Ccl3				EAN1pec				EUI1C				Symbionte de <i>D. glomerata</i>			
				Score	% identité	Écart	Fragment (nt)	Score	% identité	Écart	Fragment (nt)	Score	% identité	Écart	Fragment (nt)	Score	% identité	Écart	Fragment (nt)
<i>cysN</i>	YP_712337.1	1245	∞	741	90	0	1245					64	88	0	107	478	85	2	1205
<i>kdpC</i>	YP_715465.1	903	∞	65	83	0	205	116	82	5	470	107	82	8	429				
<i>capD</i>	YP_715815.1	2067	108,1	701	85	0	1801	267	80	4	1295	205	82	8	777	129	78	3	1023
<i>thiC</i>	YP_711068.1	1971	99,5	666	88	0	1246	506	85	2	1257	504	85	0	1244	622	87	0	1254
<i>braG</i>	YP_711002.1	804	15,6	326	87	0	670					151	86	0	351				
<i>sigH</i>	YP_716132.1	900	11,1	465	90	0	773	378	88	0	742	381	88	0	729	332	87	0	668
<i>tmk</i>	YP_716707.1	645	7,6	123	81	4	560												
<i>iscS</i>	YP_715302.1	1194	6,5	283	82	2	1078	94	86	0	222	83	85	0	207	62	80	0	294
<i>end8</i>	YP_715876.1	906	4																
<i>ileS</i>	YP_712435.1	3237	3,3	1526	87	12	3077	718	84	16	2056	718	84	14	2038	450	85	0	1078
<i>atpD</i>	YP_716074.1	1461	-16,9	1048	93	0	1456	995	92	0	1455	897	90	0	1449	648	86	2	1439
<i>glyA</i>	YP_711383.1	1263	-∞	659	89	0	1199	327	82	2	1146	417	85	0	1061				
FRAAL3312	YP_713521.1	753	∞																
FRAAL3138	YP_713349.1	408	∞																
FRAAL3513	YP_713719.1	1176	∞																
FRAAL4726	YP_714910.1	1011	∞																
FRAAL0433	YP_710720.1	219	∞																
FRAAL1349	YP_711599.1	516	288,7	177	87	0	381												
FRAAL3700	YP_713904.1	783	214,2																
FRAAL5031	YP_715211.1	156	194,7																
FRAAL0329	YP_710616.1	1029	169,9																
FRAAL0828	YP_711095.1	390	129,7	55	83	0	175	89	87	0	185								
FRAAL3685	YP_713889.1	141	105,2																
FRAAL2459	YP_712678.1	1494	95,5	48	84	0	140	141	82	0	533	199/185	84/82	0/3	535/636				
FRAAL3389	YP_713598.1	450	63,7																
FRAAL5034	YP_715214.1	1284	51,8																
FRAAL1784	YP_712022.1	246	45,1																
FRAAL3599	YP_713804.1	150	34																
FRAAL2995	YP_713207.1	1104	27,6					30	100	0	30								
FRAAL3826	YP_714029.1	1248	23																
FRAAL2867	YP_713079.1	957	22,8									225	82	0	825				
FRAAL3033	YP_713244.1	405	21,9																
FRAAL0899	YP_711162.1	696	21,3	81/57	87/82	0/0	173/193												
FRAAL4910	YP_715093.1	711	20,9																
FRAAL2028	YP_712259.1	1026	19,7																
FRAAL1958	YP_712190.1	771	17,4	161/70	82/90	0/0	573/118												
FRAAL3598	YP_713803.1	1077	15,7																

Gène	GenBank	Fragment	Facteur de	CcI3				EAN1pec				EUI1C				Symbiote de <i>D. glomerata</i>			
		(nt)	variation	Score	% identité	Écart	Fragment (nt)	Score	% identité	Écart	Fragment (nt)	Score	% identité	Écart	Fragment (nt)	Score	% identité	Écart	Fragment (nt)
FRAAL2084	YP_712313.1	674	15,1	332	88	0	631	205	85	0	536	124	84	2	382				
FRAAL3011	YP_713223.1	3606	13,4																
FRAAL2827	YP_713040.1	1296	11,5																
FRAAL3767	YP_713971.1	222	11																
FRAAL1613	YP_711857.1	441	10,3																
FRAAL1775	YP_712013.1	348	9,8																
FRAAL0349	YP_710637.1	10101	8,8																
FRAAL3605	YP_713810.1	744	8,3																
FRAAL4807	YP_714991.1	960	7,9																
FRAAL0882	YP_711146.1	1887	7,5																
FRAAL1130	YP_711388.1	636	7,5																
FRAAL3948	YP_714148.1	423	7,4																
FRAAL2565	YP_712784.1	1581	6,9																
FRAAL0421	YP_710708.1	669	6,9																
FRAAL2156	YP_712384.1	1452	6,1																
FRAAL3088	YP_713299.1	618	5,8																
FRAAL4570	YP_714756.1	1083	5,7	312	84	0	860	119	80	3	591	58	96	0	70	44	83	0	132
FRAAL3709	YP_713913.1	855	5,6	56	87	0	116	325/139	85/83	0/0	801/459	176	83	0	548				
FRAAL2023	YP_712254.1	171	5,3																
FRAAL5044	YP_715224.1	1161	5,1																
FRAAL0987	YP_711248.1	633	4,9																
FRAAL4908	YP_715091.1	843	4,8																
FRAAL4463	YP_714654.1	654	4,1																
FRAAL3769	YP_713973.1	1869	3,5																
FRAAL1138	YP_711395.1	381	3,4																
FRAAL1345	YP_711595.1	726	3																
FRAAL1426	YP_711674.1	498	2,2																
FRAAL4195	YP_714389.1	1713	-2,9																
FRAAL3468	YP_713676.1	1098	-3,7																
FRAAL2770	YP_712984.1	381	-4,5																
FRAAL5103	YP_715281.1	300	-4,6																
FRAAL4664	YP_714849.1	198	-5,7																
FRAAL1938	YP_712170.1	168	-6,2																
FRAAL3844	YP_714046.1	339	-6,5																
FRAAL1739	YP_711978.1	414	-6,7																
FRAAL2430	YP_712650.1	501	-6,8																
FRAAL1989	YP_712221.1	585	-18,3																
FRAAL0148	YP_710440.1	1074	-25,3																
FRAAL3384	YP_713593.1	1200	-40,1																
FRAAL4890	YP_715073.1	492	-∞																

Gris = gène absent

Blanc = gène présent

Fragment (nt) = longueur de la séquence en nucléotides

Écart = saut dans la séquence

% identité = % d'homologie (nt identiques, écarts)

Score = valeur de pertinence biologique d'un alignement

Tableau 6 : Détermination de la concentration et la qualité des échantillons d'ARN extraits.

Jour	Réguliers 1		Réguliers 2		Réguliers 3		Toruleux 1		Toruleux 2		Toruleux 3	
	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl
8	9,6	535	9,6	414	9,6	437	8	270	8	201	7,8	270
14	9,2	746	8,8	578	8,4	567	6,9	388	6,7	361	N/A	461

Avec les paramètres du q-PCR optimisés, il était possible de procéder à la détermination de l'expression relative des gènes dans une culture de 8 et 14 jours. L'analyse des résultats de q-PCR a été effectuée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Au jour 8, chez la souche ACN14a différenciée en RTH, les gènes *kdpC*, *atpD* et FRAAL2827 étaient sous-exprimés, les gènes *capD*, *thiC*, FRAAL3700 et FRAAL2028 sont surexprimés et les gènes *sigH*, *ileS* et FRAAL2084 demeurent stables (figure 19). Au jour 14, les gènes *kdpC*, *atpD*, FRAAL2084 et FRAAL2827 sont sous-exprimés, les gènes *capD*, *sigH*, *ileS*, FRAAL3700 et FRAAL2028 sont surexprimés et le gène *thiC* demeure stable (figure 19). Certains gènes conservent la même expression relative aux jours 8 et 14 (*kdpC*, *atpD*, FRAAL3700 et FRAAL2028), tandis que les autres gènes n'ont pas le même niveau d'expression selon la journée de l'extraction de l'ARN. Les résultats obtenus avec le gène de référence *dnaG* donnent un patron similaire pour chacun des gènes.

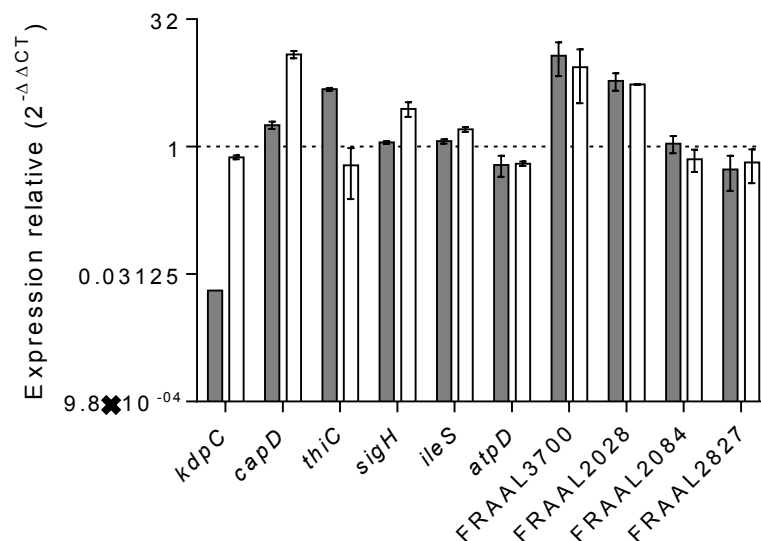


Figure 19 : Expression relative de gènes étudiés au jour 8 et au jour 14. L'expression relative est le rapport de l'expression des hyphes toruleux sur l'expression des hyphes végétatifs. Les bandes blanches correspondent au jour 8 et les bandes grises correspondent au jour 14. Les résultats sont relativisés par rapport aux gènes de référence *gyrB* et *dnaG*. Les moyennes sont déterminées par trois réplicats biologiques. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. La ligne pointillée consiste à un ratio d'expression de 1 (aucune différence entre les hyphes toruleux et les hyphes végétatifs).

2.3.3 Évaluation de l'expression relative des gènes au fil des jours par q-PCR

De nouvelles extractions d'ARN ont été effectuées à différents temps de culture pour déterminer l'effet de l'âge de la culture sur l'expression des gènes. Chaque extrait d'ARN a été analysé à l'aide du *Bioanalyzer 2100* d'Agilent pour en déterminer l'intégrité et la concentration en acides nucléiques de l'extrait (tableau 7). Les résultats obtenus sont satisfaisants pour poursuivre les réactions de q-PCR.

Tableau 7 : Détermination de la concentration et la qualité des échantillons d'ARN extraits pour le suivi dans le temps de l'expression génique.

Jour	Réguliers 1		Réguliers 2		Réguliers 3		Toruleux 1		Toruleux 2		Toruleux 3	
	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl	RIN	ng/μl
2	N/A	5	10	23	9,9	34	9,9	27	9,3	33	9,9	21
4	10	72	10	71	10	96	9,2	46	8,7	35	8,6	47
6	10	98	10	54	10	86	8,1	79	8	57	8,1	68
8	10	327	10	277	10	254	7	139	7	66	7,3	144
10	9,9	407	10	233	10	342	7,3	106	7,3	98	7,4	105
12	10	406	10	630	10	588	6,8	258	7	149	7,2	221
14	10	190	10	338	10	287	7,2	61	7,5	47	7,5	55
28	9,9	686	10	504	10	588	5,4	28	6,4	47	6,8	68

L'analyse des résultats de q-PCR a été effectuée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La figure 20 représente la moyenne d'expression relative pour chacun des gènes étudiés. En moyenne, les gènes *thiC* et FRAAL2827 sont sous-exprimés, *atpD* est neutre et les autres sont surexprimés. Les résultats obtenus avec le gène de référence *dnaG* donnent un patron similaire pour chacun des gènes.

Les expressions relatives obtenues pour chaque gène aux différents jours d'extraction, sont représentées à la figure 21. Plusieurs gènes, comme *kdpC*, *capD*, *thiC*, *sigH*, *ileS*, FRAAL3700, FRAAL2028 et FRAAL2827, ont un abaissement de l'expression relative aux jours 8 et 10. Ces gènes suivent la même tendance, toutefois les différences entre les jours sont non-significatives pour la plupart des gènes. Les gènes *atpD* et FRAAL2084 demeurent stables dans le temps. Le gène *atpD* n'est pas exprimé significativement différemment selon les jours, tandis que le gène FRAAL2084 est exprimé significativement différemment au jour 4. Les résultats obtenus avec le gène de référence *dnaG* sont similaires. Pour permettre d'identifier les interactions possibles entre certains gènes, des graphiques ont été tracés pour

voir les corrélations entre l'expression des différents couples de gènes. Onze couples de gènes corrélaient entre eux (figure 22).

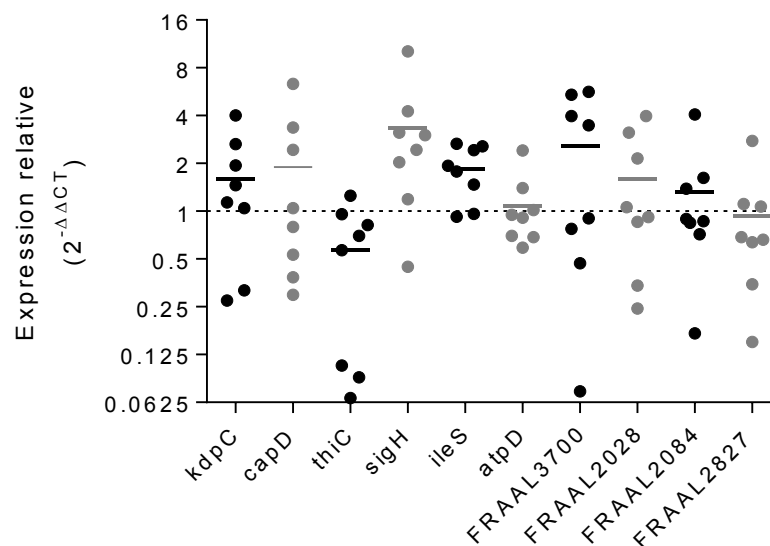
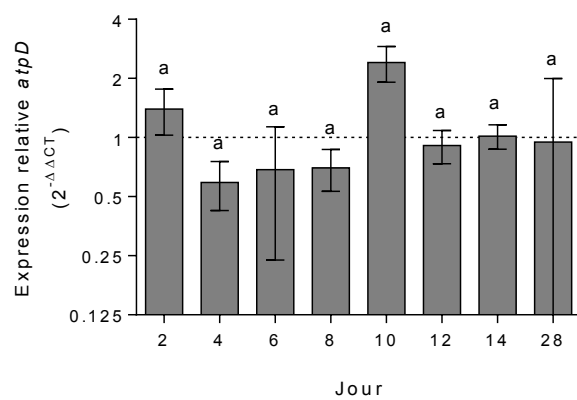
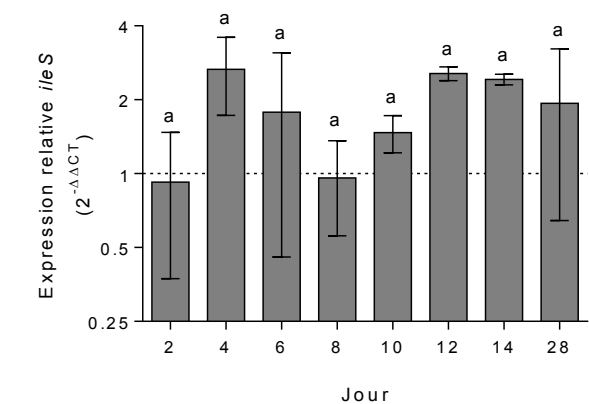
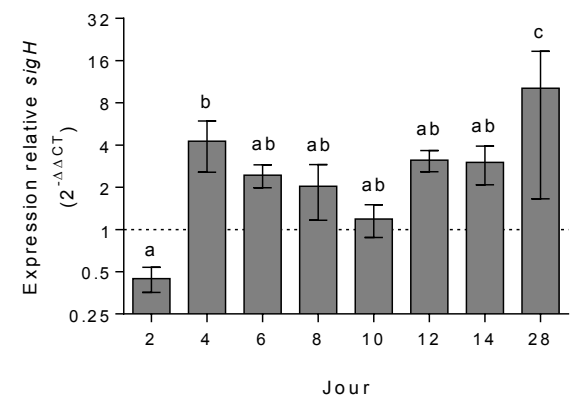
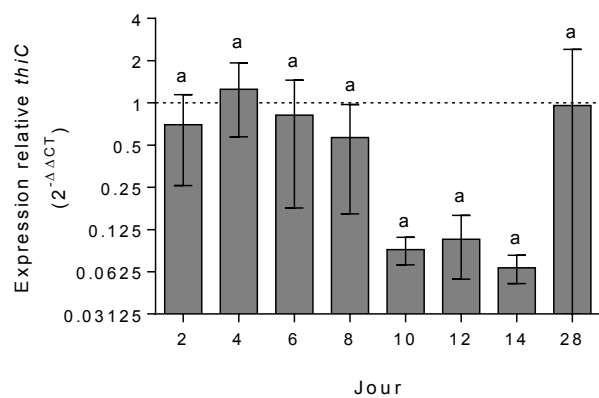
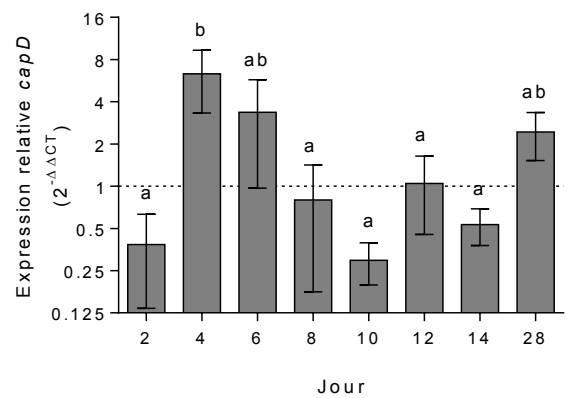
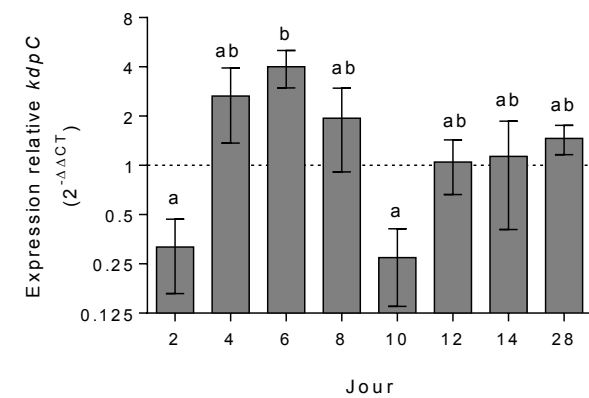


Figure 20 : Résultats cumulatifs du suivi dans le temps de la valeur d'expression relative moyenne obtenue pour chaque gène étudié. L'expression relative est le rapport de l'expression des hyphes toruleux sur l'expression des hyphes végétatifs. Les résultats sont relativisés par rapport aux gènes de référence *gyrB* et *dnaG*. Chaque point représente une valeur d'expression relative à chacun des jours 2,4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 28. La ligne pointillée consiste a un ratio d'expression de 1 (aucune différence entre les hyphes toruleux et les hyphes végétatifs).

FRAAL2028 corrélait avec 4 autres gènes : *kdpC*, *capD*, *sigH* et FRAAL2827. *capD* corrélait aussi avec FRAAL2084 et FRAAL2827 avec *ileS*. *atpD* et FRAAL2084 corrélaient ensemble. La corrélation entre le gène FRAAL2084 et *atpD* est corrélée négativement, tandis que les autres corrélations sont corrélées positivement.



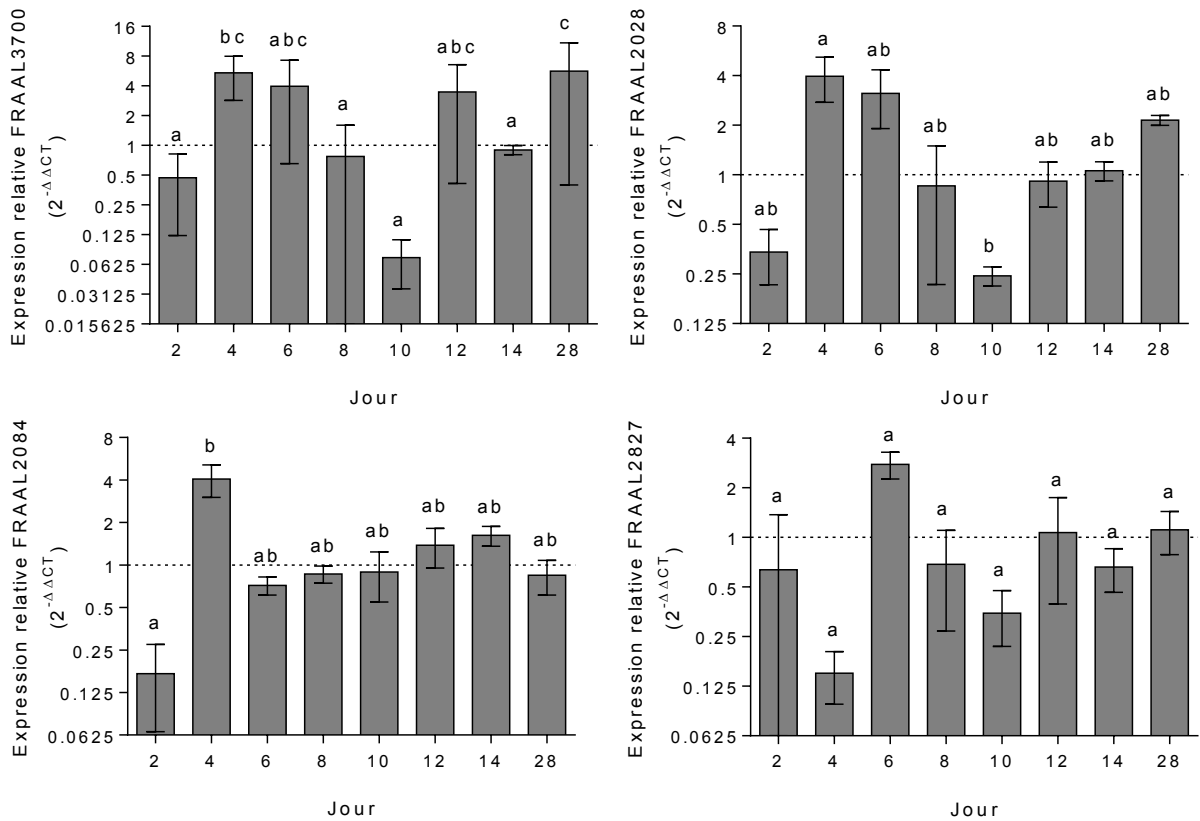
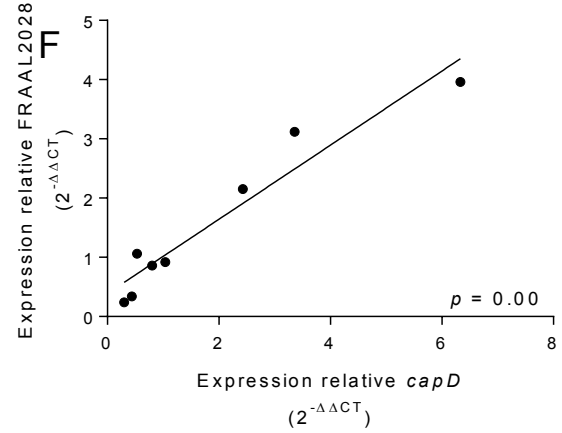
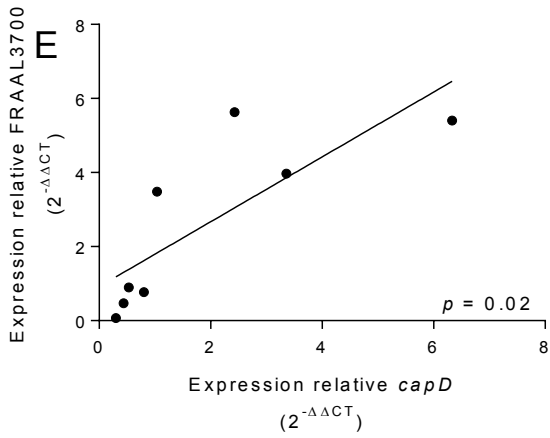
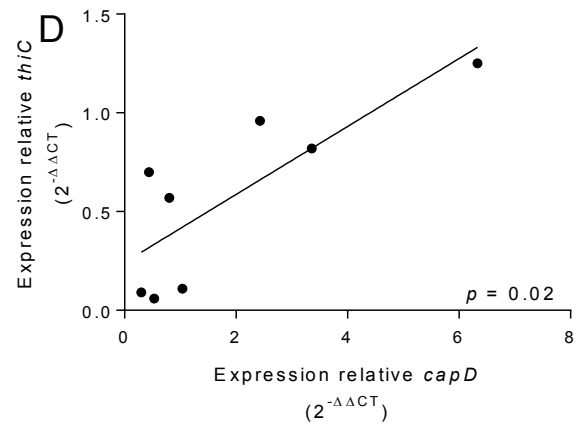
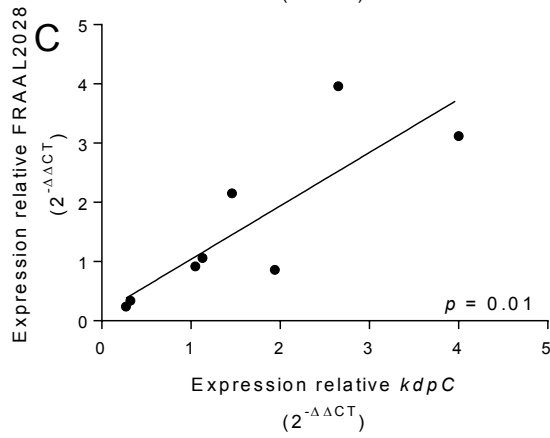
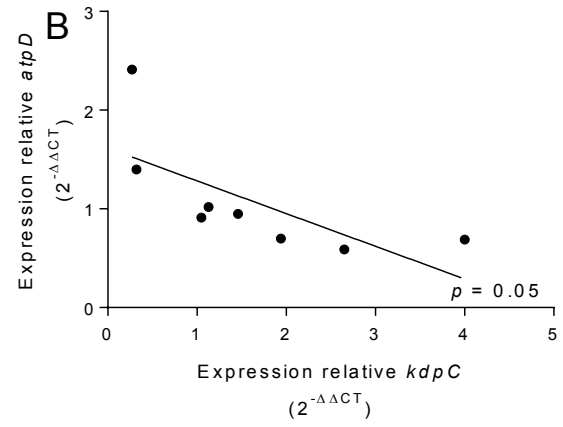
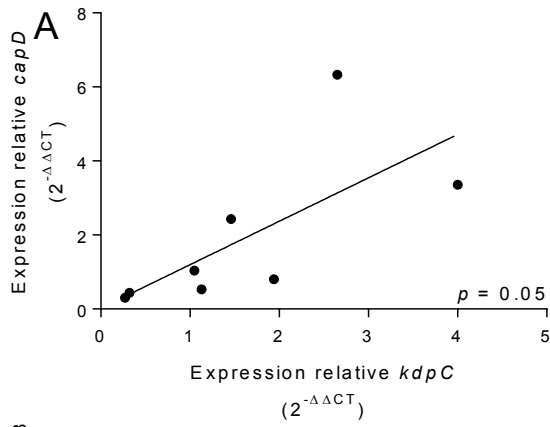


Figure 21 : Expression relative des gènes de *Frankia alni* ACN14a différenciée en hyphes toruleux à différents temps de culture déterminée par q-PCR par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. L'expression relative est le rapport de l'expression des hyphes toruleux sur l'expression des hyphes végétatifs. Les résultats sont relativisés par rapport au gène de référence *gyrB* et *dnaG*. Les moyennes sont déterminées par trois réplicats biologiques. Les barres d'erreurs représentent des écarts-types. La ligne pointillée consiste a un ratio d'expression de 1 (aucune différence entre les hyphes toruleux et les hyphes végétatifs). Les lettres identiques signifient qu'il n'y a pas de différences significatives, tandis que des lettres différentes indiquent une différence significative (ANOVA deux voies (tests multiples) suivies d'un test de Tukey, significatif à $p < 0,05$).



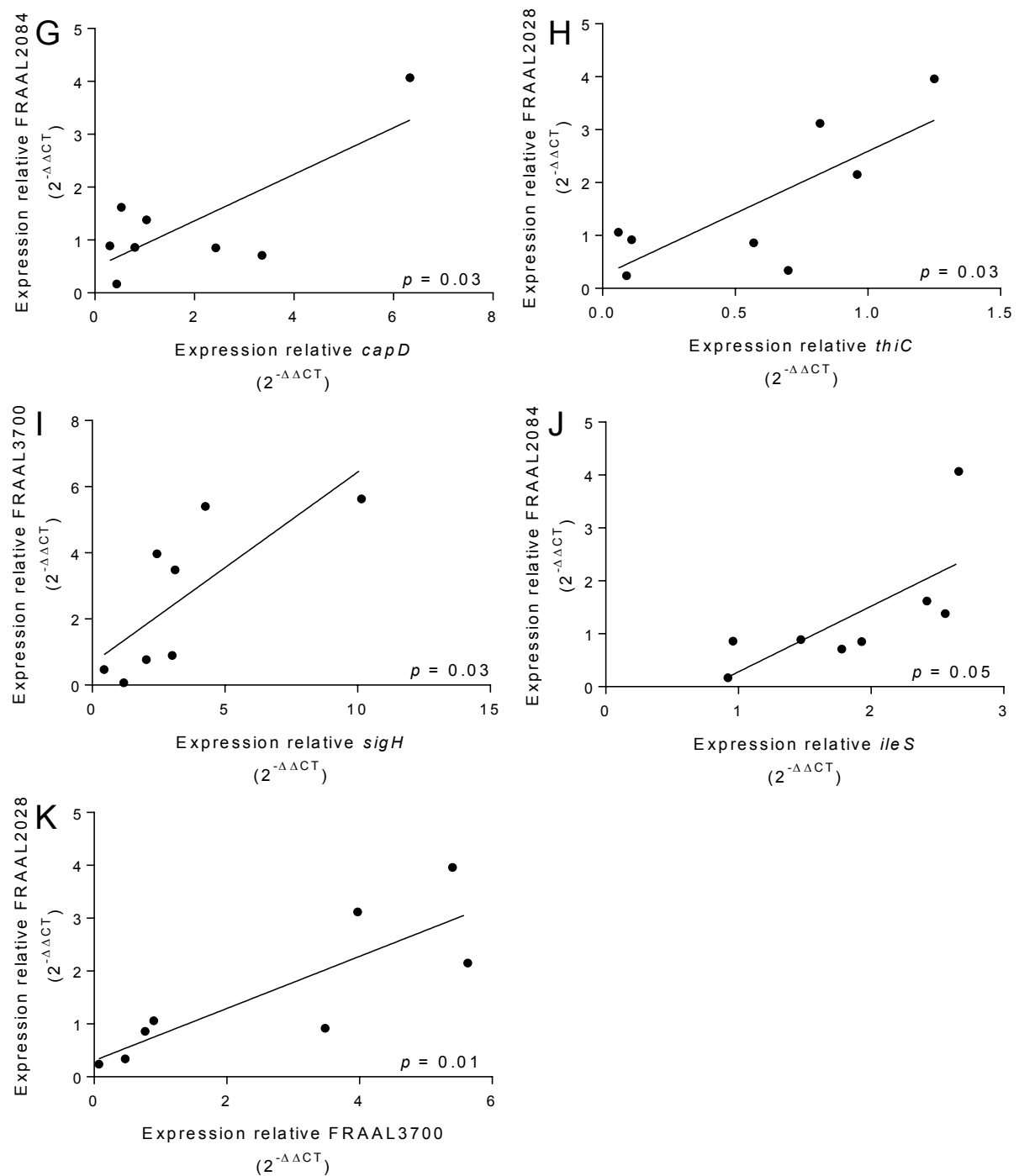


Figure 22 : Détermination de la présence de corrélations entre les gènes par des régressions linéaires. Les graphiques présentés sont ceux ayant des régressions linéaires statistiquement valables ($p < 0,05$).

DISCUSSION

3.1 Évaluation de la capacité de différenciation de souches de *Frankia* avec ajout temporel ou instantané de l'agent inducteur

Les connaissances sur le processus de différenciation des hyphes toruleux doivent être approfondies. La détermination de la concentration réelle de KH_2PO_4 nécessaire à la différenciation massive en hyphes toruleux chez la souche *F. alni* ACN14a a été effectuée en microplaques. Dans les essais, une mesure de la respiration cellulaire via le MTS-PMS (Bélanger *et al.*, 2011) est comparée avec la prise du pH dans les puits et d'une observation microscopique par épifluorescence avec le colorant *LIVE/DEAD*®. L'étude précédente évaluait l'effet du pH et l'effet de la concentration de KH_2PO_4 indépendamment l'un de l'autre (Bernèche-D'Amours, 2012). Pour compléter cette étude, nous avons évalué la présence de différenciation aux concentrations de KH_2PO_4 se trouvant entre le 1x (10 mM) et 5x (50 mM) dans le milieu BAPS à pH 5,8-5,9 (Bernèche-D'Amours, 2012). Il était important de déterminer la plus faible concentration de KH_2PO_4 permettant d'obtenir une différenciation massive en hyphes toruleux, pour limiter le stress appliqué sur les cellules et augmenter la viabilité cellulaire et la quantité de cellules différenciées.

La différenciation se produit à partir d'une concentration de 40 mM de KH_2PO_4 , à cette concentration une baisse drastique de la respiration cellulaire est perceptible. Le pH est d'environ de 5,9 dans les puits non inoculés alors qu'il est de 6,3 dans les puits inoculés. En microscopie les cellules vivantes sont différenciées en hyphes toruleux et une proportion de 50 % environ des hyphes sont morts (figure 10). Toutefois aucune amélioration dans le taux de viabilité et dans la qualité de différenciation n'est perçue à 40 mM comparés à 50 mM. Une deuxième série de microplaques où était ajouté graduellement le KH_2PO_4 sur 12 jours, pour

atteindre les mêmes concentrations finales que précédemment, n'a pas permis d'améliorer le taux de viabilité lors de la différenciation. Une habitude ou une consommation est tout de même observée, car la concentration nécessaire à la différenciation passe de 40 mM à 60 mM de KH_2PO_4 (figure 10). Donc, le temps pour atteindre la concentration nécessaire à la différenciation permet à *Frankia* de se diviser et la densité cellulaire augmente dans la culture. La densité cellulaire de la culture influence la différenciation. Il a été démontré que pour obtenir une bonne différenciation une densité cellulaire équivalente à 5 µg/ml de protéine est utilisée et des concentrations supérieures (15-30-75 µg/ml) diminuent le rendement obtenu (Bernèche-D'Amours, 2012).

Des expériences similaires aux précédentes ont été effectuées chez *Frankia* spp. (AvcI1, ARgP5, ACN10a, ACN13h CcI3et Cj1-82), ce qui permet de conclure que seulement *F. alni* ACN14a se différencie massivement en hyphes toruleux dans les conditions testées. Au niveau génétique les souches sont similaires pour le gène de l'ADN ribosomal 16S, mais différentes pour le gène *rpoB* qui permet en général de séparer phylogénétiquement les souches rapprochées de *Frankia* selon les groupes de compatibilité avec les plantes hôtes (Bernèche-D'Amours et al., 2011). Les seules souches étudiées qui ne pouvaient pas être discriminées par le gène *rpoB* étaient *F. alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a (Bernèche-D'Amours et al., 2011). Toutefois, la souche *Frankia* sp. ACN10a répond à une augmentation de la concentration en KH_2PO_4 , mais la morphologie obtenue est plutôt des sporanges intercalaires, mais avec présence de quelques sporanges multiloculaires, à une concentration de 25 mM de KH_2PO_4 (figures 10 et 11). De façon à déterminer plus précisément le type de sporanges observés, de la microscopie confocale aurait permis de différencier les deux types. Un autre facteur intéressant est que ces deux souches alcalinisent leur milieu lors de leur croissance. D'autres actinobactéries alcalinisent le milieu de culture durant leur croissance, par exemple le genre *Streptosporangium* et certaines espèces de *Streptomyces* (Hobbs et al., 1992; Pfefflerle et al., 2000). Une explication possible est que les cellules libèrent des molécules aminées comme des acides aminés basiques ou de l'ammoniaque (NH_3) dans le milieu. *Neurospora crassa* et *Aspergillus fumigatus* sont des exemples de champignons qui produisent du NH_3 à partir de

composés endogènes dans des conditions limitantes de nutriments (St Leger *et al.*, 1999). Il est suggéré que la capacité d'alcaliniser est adaptative et permettrait de faciliter l'assimilation de nutriments par des enzymes extracellulaires, car certaines enzymes (ex. désaminases) sont produites ou actives à des pH spécifiques (St Leger *et al.*, 1999). *Frankia* est une bactérie se retrouvant dans le sol où certains nutriments sont limités. L'amélioration de l'assimilation est un avantage pour les souches alcalinisant leur milieu. Les autres souches testées conservent une croissance et un pH stable, peu importe la concentration de KH_2PO_4 ajoutée dans le milieu.

3.2 Détermination du stimulus impliqué dans la différenciation en hyphes toruleux

Bernèche-D'Amours (2012) a démontré que le pH à 5,8-5,9 semble indispensable à la différenciation cellulaire en hyphes toruleux. Il était intéressant de vérifier l'importance du K^+ et du PO_4^{3-} indépendamment. Pour ce faire, un ajout de KCl ou de NaH_2PO_4 a été fait dans des milieux BAPS au pH 5,8-5,9. Un essai similaire avait été effectué précédemment par Bernèche-D'Amours (2012) et le KCl n'induisait pas la différenciation dans les conditions testées. Toutefois les milieux de culture avaient un pH de 6,0 et une légère augmentation de 0,2 du pH ne permet pas d'obtenir massivement des hyphes toruleux (observation personnelle). Lorsque le pH redevient assez élevé, une reprise de croissance en hyphes réguliers est observée.

Dans l'essai où les pH étaient bien à 5,8-5,9, les observations microscopiques montrent la présence de la morphologie toruleuse seulement avec l'ajout de KCl et non l'ajout de NaH_2PO_4 (figure 12). Ceci suggère que le K^+ combiné avec le pH 5,8-5,9 sont les inducteurs des hyphes toruleux. Les morphologies observées en microscopie électronique à transmission et les épaisseurs des parois sont identiques pour les cellules différenciées se trouvant dans le milieu avec du KH_2PO_4 et du KCl (figures 13 et 14). Le K^+ , en général, joue un rôle de soluté

osmotique, d'activateur enzymatique, de second messenger et facilite l'adaptation aux pH (Alahari *et al.*, 2001; Epstein, 2003; Yan *et al.*, 2011). Chez *E. coli*, l'abaissement du pH de 7 à 5,6 dans le milieu entraîne une baisse de pH interne de 0,4, mais le pH interne redevient normal après 3-4 minutes en présence de K^+ . Cependant, lorsque la concentration de K^+ est basse, le retour à un pH interne normal est beaucoup plus long (Booth, 1985). La majorité du transport de K^+ est régulée par la pression osmotique et non par la concentration de celui-ci, donc il est proposé qu'un transport passif de K^+ peut avoir lieu (Booth, 1985).

3.3 Intermédiaires du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est important pour le métabolisme des sucres, des lipides et des acides aminés. Le rôle des enzymes du cycle de Krebs est de maintenir le métabolisme balancé de façon à permettre la croissance cellulaire, le développement morphologique et le métabolisme secondaire (Viollier *et al.*, 2001). Chez *Bacillus subtilis* et *S. coelicolor*, le cycle de Krebs doit être fonctionnel et les métabolites intermédiaires doivent être équilibrés pour permettre la formation des spores (Viollier *et al.*, 2001). L'ajout d'intermédiaires du cycle de Krebs dans les différents milieux, ce qui crée un déséquilibre dans les ratio d'intermédiaires, a permis de déterminer l'impact de ceux-ci sur l'état morphologique de *F. alni* ACN14a. Dans les milieux à pH 6,7 sans inducteurs de différenciation, aucun intermédiaire n'a permis d'obtenir de différenciation massive. Lorsque l'ajout d'intermédiaires était combiné au milieu d'induction à pH 5,8-5,9, une inhibition de la différenciation était observée avec les intermédiaires suivants; le citrate, le *cis*-aconitate, le D-isocitrate, l' α -cétoglutarate et le fumarate (figures 15 et 16). Les vitesses de trois réactions sont limitantes pour le cycle de Krebs; les réactions catalysées par la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Leurs activités sont inhibées par l'ATP et le NADH, H^+ . De plus, la citrate synthase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase sont inhibées par leurs produits (le citrate et le succinyl-CoA) (Moussard, 2006).

Nous concluons donc que l'ajout de citrate dans le milieu de culture vient inhiber le cycle de Krebs et la différenciation en hyphes toruleux est aussi inhibée. La consommation de l'isocitrate et de l' α -cétooglutarate produit du NADH, H^+ qui inhibe le cycle, par le fait même la différenciation en hyphes toruleux. Un excès de *cis*-aconitate inhibe le cycle de Krebs par sa transformation en citrate (réaction réversible) ou par sa transformation en isocitrate. Le fumarate produit du $FADH_2$, mais ce produit est non mentionné comme étant un inhibiteur du cycle.

3.4 Détermination de l'effet d'une limitation en azote exogène sur la différenciation en hyphes toruleux

Le métabolisme de l'azote (formation de vésicules) ne semble pas avoir un lien avec la différenciation en hyphes toruleux. Toutefois, la fixation de l'azote est très énergivore : pour réduire et assimiler une molécule de N_2 en NH_4^+ , il faut entre 14 et 26 ATP et 2 NAD(P)H (Benson et Schultz, 1990). Dans les milieux BAPS sans NH_4Cl , le contenu cellulaire n'est pas uniformément distribué dans les hyphes, car le métabolisme est plutôt tourné vers la fixation d'azote (figure 17). Le bilan énergétique ne permet possiblement pas la différenciation en hyphes toruleux au même moment que le développement des vésicules et de la fixation d'azote.

3.5 Évaluation de l'état cellulaire de *Frankia* différencié dans le temps

Le suivi de molécules (protéines, ADN db, sources de carbone, PO_4^{3-} , biomarqueurs) en condition d'hyphes toruleux permet bien sûr de constater que les différentes molécules demeurent assez stables. Toutefois, il semble y avoir une légère augmentation de la

concentration des protéines et de l'ADN db et une légère baisse du propionate lorsque les cultures atteignent 40 jours (figure 18). Le dosage du succinate demeure stable autant pour les hyphes réguliers que les hyphes toruleux. La souche *F. alni* ACN14a semble consommer préférentiellement le propionate (figure 18). Le dosage du PO_4^{3-} demeure stable dans le temps autant pour les hyphes réguliers que les hyphes toruleux. Même si l'on s'attendait à une baisse, car le PO_4^{3-} est un nutriment (figure 18). Les hyphes toruleux ne subissent pas de division cellulaire, mais ont tout de même un métabolisme actif (Bernèche-D'Amours, 2012). La faible consommation de propionate et les légères augmentations de concentration protéique et d'ADN viennent démontrer que les hyphes toruleux sont des structures non en dormance et qu'il y a une augmentation du contenu cellulaire. De plus, lors de la différenciation environ 50 % des cellules meurent (Bernèche-D'Amours, 2012). Dû à la mortalité et à la non-division des hyphes, la production de protéines, d'ADN, le pH, le phosphate et les sources de carbone demeurent stables.

L'analyse des données obtenues lors des dosages des biomarqueurs a permis d'observer des courbes différentes selon le type de cellules observées (réguliers ou toruleux) (figure 19). Certains biomarqueurs peuvent renseigner sur l'état physiologique des cellules et de la culture, plus il y a croissance plus certaines molécules seront présentes dans l'échantillon, les acides aminés, l'ATP et le NADH. De plus une longueur d'onde permet de déterminer l'autofluorescence émise par les bactéries. Cette technique serait intéressante pour effectuer des criblages de *Frankia* dans différents milieux d'induction potentiels, de façon à tester plusieurs conditions en parallèle et sélectionner rapidement ceux d'intérêt pour des analyses plus poussées.

3.6 Alignement des gènes d'intérêts de *Frankia alni* ACN14a avec le génome d'autres souches

Une analyse plus approfondie par bio-informatique des gènes d'intérêt dans la différenciation a permis de constater que la majorité des gènes sont présents que chez *F. alni* ACN14a (tableau 5). L'absence de ces gènes chez les autres souches pourrait expliquer l'impossibilité qu'elles ont de se différencier dans les mêmes conditions de culture. Certains gènes possèdent de courtes séquences homologues dans les autres génomes, ce qui peut modifier l'activité de la protéine produite (séquence modifiée, séquence tronquée). Cet effet pourrait aussi venir empêcher certaines souches de se différencier en hyphes toruleux.

3.7 Évaluation de l'expression relative des gènes au fil des jours par q-PCR

L'ajout de KH_2PO_4 dans le milieu entraîne deux stress; de pH et osmotique. La pression osmotique induit l'expression de gènes liés à la réponse aux stress ou aux processus cellulaires (Matsumoto *et al.*, 2013), donc dix gènes ayant un lien avec le stress appliqué ont été sélectionnés dans la liste de l'étude transcriptomique faite par Bernèche-D'Amours (2012). Les dix gènes sélectionnés pour les expériences sont soit des gènes impliqués dans l'acquisition du potassium, des régulateurs transcriptionnels ou des gènes de synthèse de différentes molécules liées au métabolisme secondaire. Les gènes *kdpC* et FRAAL2084 permettent le transport du K^+ et sont légèrement surexprimés en condition de différenciation en hyphes toruleux (figure 21 et 22). Dû à la plus grande concentration de KH_2PO_4 dans le milieu d'induction d'hyphes toruleux, la pression osmotique augmente et une signalisation cellulaire a lieu en réponse à la turgescence bactérienne via le gène *kdpC* (Epstein, 2003). FRAAL2084 correspond à la sous-unité A du transporteur de potassium Trk. Le K^+ est important dans le maintien de la turgescence cellulaire et elle est importante au niveau de la croissance et de la morphologie bactérienne (Alahari *et al.*, 2001; Epstein, 2003), donc le

transport du potassium semble important dans la différenciation cellulaire en hyphes toruleux. Les régulateurs transcriptionnels pourraient contrôler le niveau d'expression de gènes importants dans la différenciation en hyphes toruleux dans le milieu d'induction. Les gènes *sigH* et FRAAL3700 sont des régulateurs transcriptionnels et sont surexprimés en milieu d'induction d'hyphes toruleux (figure 21 et 22). Chez *Corynebacterium glutamicum*, le gène *sigH*, induit par un choc osmotique, contrôle l'opéron F₀F₁ ATP synthase liée au stress de pH (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2013). Le rôle du gène *sigH* chez *Streptomyces coelicolor* est lié aux chocs osmotiques et à la différenciation morphologique. Il a aussi été démontré que le gène *sigH* est important dans la différenciation des hyphes aériens, une mutation de *sigH* entraîne une incapacité à produire les septations (Sevciková *et al.*, 2001). Dû aux rôles démontrés de *sigH* chez d'autres actinobactéries, on peut présumer que ce gène est important dans la différenciation en hyphes toruleux. Le gène *sigH* pourrait être responsable de l'expression de certains des autres gènes. Plusieurs gènes ont une expression relative qui diminue au jour 8 et 10 comme le gène *sigH* (figure 22). Le gène FRAAL3700 est un régulateur de transcription ayant un motif AraC. Chez *Streptomyces griseus*, le facteur de transcription AdpA (motif AraC/XylS) régule des gènes pour la biosynthèse de la streptomycine et certains gènes reliés à la différenciation cellulaire (Horinouchi et Beppu, 2007). La différenciation en hyphes toruleux pourrait avoir un lien avec le métabolisme secondaire, donc le moment auquel la synthèse d'antibiotique a généralement lieu. Les gènes *capD* et FRAAL2028 pourraient être responsables de la production de métabolites secondaires et leur expression relative augmente dans la condition de différenciation en hyphes toruleux (figure 21 et 22). Le gène *capD* code pour une dTDP-glucose 4,6-déshydratase qui convertit le dTDP-glucose en dTDP-4-céto-6-déoxyglucose et permet la production de métabolites secondaires comme les antibiotiques (Hegeman *et al.*, 2001).

FRAAL2028 code pour une glycane synthase qui modifie les molécules de carbohydrates (Hug et Feldman, 2011). Cette modification pourrait venir jouer un rôle dans la formation de métabolites secondaires. Le gène *ileS* code pour un isoleucyl-ARNt synthetase joue un rôle important dans la synthèse protéique. L'expression relative de ce gène est augmentée dans la

condition de différenciation en hyphes toruleux (figure 21 et 22). Une baisse de l'expression relative des gènes *thiC* et FRAAL2827 a été observée lors de la différenciation en hyphes toruleux (figure 21 et 22). Le gène *thiC* produit de la thiamine pyrophosphate, un dérivé de la thiamine. Il est un cofacteur du métabolisme des carbohydrates (Zhang *et al.*, 1997; Taboada *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2012). Le gène FRAAL2827 code pour une protéine de transfert de lipide possédant un domaine thiolase. Ce genre de protéine permet la production d'acide gras, de stéroïdes, de polycétides et de mévalonate (Meriläinen *et al.*, 2009; Okamura *et al.*, 2010). Ces diminutions sont potentiellement dues à l'arrêt de croissance et à la mortalité obtenue suite à la différenciation cellulaire. Le dernier gène étudié, *atpD*, code pour la sous-unité β de la F_0F_1 ATP synthase et il demeure stable dans les deux conditions. Il ne serait donc pas un gène spécifique dans la différenciation en hyphes toruleux (figure 21 et 22).

CONCLUSION

L'actinobactérie *Frankia* sp. est reconnue pour avoir différentes morphologies. Parmi celles-ci se retrouvent les hyphes toruleux. Cette morphologie a été découverte en 1985 par Diem et Dommergues. Toutefois dans les revues de littérature récentes sur *Frankia*, cette morphologie n'est pas abordée. *F. alni* ACN14a, une souche d'intérêt dans nos recherches, démontrait la présence de cellules ressemblant aux hyphes toruleux en faible proportion dans le milieu de culture BAPS. L'élaboration d'une condition de culture reproductible permettant la différenciation massive chez la souche *F. alni* ACN14a, a permis d'amorcer l'étude de cette morphologie. Une augmentation de la concentration de KH_2PO_4 à 50 mM dans le milieu BAPS et l'abaissement du pH à 5,8-5,9, entraîne la différenciation massive en hyphes toruleux. Les causes exactes provoquant la différenciation ne sont pas connues. Toutefois, l'abaissement du pH semble essentiel à la différenciation.

Il est important d'approfondir nos connaissances sur le processus de différenciation pour mieux comprendre le cycle de vie de *F. alni* ACN14a et pouvoir mettre en place des utilisations biotechnologiques possibles de ce type cellulaire. Ma première hypothèse consistait à améliorer les conditions de culture permettant d'obtenir les hyphes toruleux et d'élargir la production chez d'autres souches de *Frankia*. La concentration minimale de KH_2PO_4 à ajouter pour obtenir des hyphes toruleux est de 40 mM. La mortalité des hyphes durant la différenciation demeure élevée. Jusqu'à présent aucune autre souche ne se différencie massivement en hyphes toruleux, *Frankia alni* ACN10a demeure une souche intéressante vu qu'elle produit des sporanges dans des conditions similaires. Les travaux ont permis de déterminer que le potassium est la molécule inductrice à la différenciation combinée au pH de 5,8-5,9. Le phosphate ne permet pas une différenciation massive. L'augmentation de la concentration de potassium dans le milieu pourrait entraîner une augmentation de la pression osmotique et induire une réponse cellulaire. Le choc osmotique et le pH acide

entraînent l'expression de facteur de stress, par exemple les facteurs σ . Les cellules différenciées ressemblent aux chaînes de spores retrouvées chez des bactéries sporulantes, comme *Streptomyces*. Les spores sont souvent un moyen de résister/persister dans des environnements difficiles pour les microorganismes. Les spores sont en général des structures en dormance. Dans le cas des hyphes toruleux de *F. alni* ACN14a ce sont des cellules métaboliquement actives qui ont une reprise de croissance rapide lorsque les conditions redeviennent normales. L'azote est un élément essentiel chez tout être vivant. Une limitation de l'azote dans le milieu de culture ne permet pas la différenciation cellulaire, malgré l'augmentation de la concentration en KH_2PO_4 dans le milieu et la diminution de pH. La fixation de l'azote demande beaucoup d'énergie. Il serait intéressant de faire un essai de réduction de l'acétylène (ARA) pour déterminer si les hyphes toruleux peuvent fixer l'azote.

Ma deuxième hypothèse de maîtrise a permis de vérifier que la présence ou le niveau d'expression de certains gènes était corrélé avec la différenciation massive en hyphes toruleux. Une analyse bio-informatique a permis de constater que les gènes différemment exprimés, lorsque les cellules sont différenciées en hyphes toruleux, étaient majoritairement retrouvés que chez *F. alni* ACN14a et non chez les autres souches séquencées complètement jusqu'à présent (CcI3, EAN1pec, EuI1c et le symbionte de *D. glomerata*). Plusieurs autres souches de *Frankia* sont disponibles, mais leurs génomes sont non séquencés. Pour raffiner les résultats obtenus, il faudrait comparer le génome de *F. alni* ACN14a avec un plus large éventail de souches séquencées. De plus la souche *Frankia* sp. ACN10a possède des différences phénotypiques avec *F. alni* ACN14a, mais au niveau phylogénétique les deux souches sont très proches (ARN16S, *rpoB*). Au laboratoire, le génome d'ACN10a a été séquencé et il possède une taille plus grande que celui de *F. alni* ACN14a, donc certainement différent (résultats non-publiés). Il serait intéressant de comparer les deux génomes. D'autre part, les dix gènes d'intérêt sélectionnés pour évaluer l'expression relative par q-PCR ont donné des niveaux d'expression généralement comparable à ceux de la transcriptomique. Il serait intéressant d'observer l'expression relative des autres gènes de la liste de 77 gènes d'intérêt dans la différenciation en hyphes toruleux. Un patron d'expression similaire dans le temps est

observé chez plusieurs des gènes, soit une diminution du niveau d'expression au jour 10 environ. La cause de cette diminution pourrait consister au cycle de vie de *Frankia alni* ACN14a, car la différenciation en hyphes toruleux est massive à partir du jour 8 environ. Le changement morphologique complet viendrait modifier le niveau d'expression des gènes étudiés. Cette diminution pourrait être causée aussi par des régulateurs de la transcription comme *sigH* et FRAAL3700. Plusieurs patrons d'expression obtenus pour les gènes étudiés suivent les mêmes tendances que ceux de *sigH* et FRAAL3700. Un séquençage d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) permettrait de voir s'il y a une interaction entre les facteurs de transcription *sigH* ou FRAAL3700 et les autres gènes. Plusieurs gènes semblent pouvoir jouer un rôle dans le métabolisme secondaire. Des analyses de surnageants de cultures pourraient permettre d'identifier des métabolites intéressants (par exemple de nouveaux antibiotiques).

Les avancements intéressants sur les connaissances des hyphes toruleux de *F. alni* ACN14a suggèrent fortement que ce morphotype est important dans son cycle de vie. L'approche exploratoire a mené à l'élaboration de pistes concernant le processus de différenciation, mais les connaissances actuelles sur cette morphologie demeurent à être approfondies. Pour faciliter l'étude des hyphes toruleux, il faudrait élaborer une technique de séparation des hyphes toruleux du matériel non différencié (et mort). Cette séparation permettrait d'obtenir des propagules individuelles. L'obtention de propagules serait intéressante pour des expériences de microscopie « time-course », des essais de conjugaison et l'obtention de cultures pures de *Frankia*.

ANNEXE

Annexe 1 : Liste de toutes les amorces utilisées pour la mise au point et les essais de q-PCR.

Gènes	Amorces	Séquences	Fragment (pb)	Statuts
<i>dnaG</i>	DNAG-F1864 DNAG-R1948	5'-CGTTTCGTCACCGCTCCTC-3' 5'-CGCGTGACATCTGTTCGT-3'	85	OK
<i>gyrA</i>	GYRA-F31 GYRA-R176	5'-GACCGCATAGAACCCATC-3' 5'-TCGTACATGGCGTAGAGGA-3'	146	Efficacité faible
<i>gyrA</i>	GYRA-F56 GYRA-R153	5'-AAGTCGAGATGCAGCGGT-3' 5'-TCGGTGGACGGGCTTGAG-3'	98	Ct trop élevé
<i>gyrA</i>	GYRA-F1575 GYRA-R1703	5'-GACCAAGACCGACCTCTACC-3' 5'-GTGAAGAACAGCAGCCAGTG-3'	128	OK
<i>gyrB</i>	GYRB-F1049 GYRB-R1177	5'-AGGGCCAGACGAAGACGAA-3' 5'-GCGACTTGCTGACGATGG-3'	129	Produits secondaires
<i>gyrB</i>	GYRB-F841 GYRB-R941	5'-AACACGATCAACACGCACGA-3' 5'-TTGAGCAGGTTCTGGTCCTT-3'	101	Efficacité faible
<i>gyrB</i>	GYRB-F1 GYRB-R151	5'-GTGGATACTTCCGCCCAGA-3' 5'-CGTAGACGAGATGGTGCAGA-3'	151	Efficacité faible
<i>gyrB</i>	GYRB-F1433 GYRB-R1529	5'-TCCTGAAGAACACCGAGGTCCA-3' 5'-ACGATCTTGTGATAGCGCAGCTTG-3'	96	OK
<i>glnA</i>	GLNA-F494 GLNA-R585	5'-GGAAGGAAGAGGGCGGCAA-3' 5'-GCGAAGATCCGTGAAATGGT-3'	92	Efficacité faible
<i>glnA</i>	GLNA-F91 GLNA-R171	5'-ATGCAGCACTTCACCATTCCGA-3' 5'-AATCGAGGACCCGTCGAACAT-3'	81	Efficacité faible

Gènes	Amorces	Séquences	Fragment (pb)	Statuts
<i>glnA</i>	GLNA-F680	5'-GCTATGACACGCTGCTGAAG-3'	62	Facteur de corrélation faible
	GLNA-R741	5'-GTTGCGGATGACGTACCTGT-3'		
<i>glnA</i>	GLNA-F569	5'-ATTTCACGGATCTTCGCTCGGA-3'	124	Efficacité faible
	GLNA-R692	5'-AGCGTGTCATAGCGGATGTCGAT-3'		
<i>glnA</i>	GLNA-F1252	5'-TCGCTGGAGAAGGTGTTGGA-3'	169	Efficacité faible
	GLNA-R1420	5'-TGTCGTCAGTAGAGGGTGAACCTCGT-3'		
<i>glnA</i>	GLNA-F69	5'-ATTCTGTGATCTGCCCCGGA-3'	54	Efficacité faible
	GLNA-R122	5'-AAGACCTGCGTCGGAATGGTGAA-3'		
<i>glnA</i>	GLNA-F419	5'-ACGTCCGCTATGACTACA-3'	128	Efficacité faible
	GLNA-R546	5'-GTAGCCGCCCTTGAAAC-3'		
<i>glnA</i>	GLNA-F148	5'-CTGATGTTTCGACGGGTCCTC-3'	149	Efficacité faible
	GLNA-R296	5'-GTGATCGGGTCGTGGATGAA-3'		
<i>glnA</i>	GLNA-F3	5'-GTTCACAAAAGCCGAGGACG-3'	83	Efficacité faible
	GLNA-R85	5'-CGGGCAGATCACAGAATCGT-3'		
<i>rpoD</i>	RPOD-F25	5'-CGAGAAGGAAGTGACGAGA-3'	117	Produits secondaires
	RPOD-R141	5'-GGTGGTGAGGAAACCGAT-3'		
<i>rpoD</i>	RPOD-F52	5'-ATGAGTCCTACCGTCCTACC-3'	80	Produits secondaires
	RPOD-R131	5'-AAACCGATCTCCTTGCCC-3'		
<i>rpoD</i>	RPOD-F656	5'-CCAAGGGCTACAAGTTCTCG-3'	134	Efficacité faible
	RPOD-R789	5'-GATGCGGCTCAGTTTGTTGA-3'		
<i>rpoD</i>	RPOD-F652	5'-TACACCAAGGGCTACAAGTTCTCG-3'	135	Efficacité faible
	RPOD-R786	5'-GCGGATCAGTTTGTTGATGGTCTC-3'		

Gènes	Amorces	Séquences	Fragment (pb)	Statuts
<i>rpoD</i>	RPOD-F664 RPOD-R786	5'-TACAAGTTCTCGACCTACGCCA-3' 5'-GCGGATCAGTTTGTGATGGTCTC-3'	123	Efficacité faible
<i>rpoD</i>	RPOD-F1049 RPOD-R1181	5'-ACCGGGAGAAGAAGGTCATCCA-3' 5'-TTCGACAGCGTCTTGGACTCGAT-3'	133	OK
<i>kdpC</i>	KDPC-F866 KDPC-R721	5'-TTGAGGCCGACGTTGAC-3' 5'-ACCGCTACGCTGACCTT-3'	146	Produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F490 KDPC-R348	5'-GCGTGACACCGACGAGTCC-3' 5'-CGTGGTAGACGGCGAGCAC3'	143	Ct trop élevé et produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F722 KDPC-R557	5'-GTGCTGATCTGCGGGTCGAG-3' 5'-CGTTCCTCGCCACCTACGC-3'	166	Produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F230 KDPC-R419	5'-TGCCGCGCTACTTCCAGA-3' 5'-AGCGTCCCTACGGCCATGCT-3'	190	Ct trop élevé
<i>kdpC</i>	KDPC-F229 KDPC-R419	5'-CTGCCGCGCTACTTCCAGA-3' 5'-AGCGTCCCTACGGCCATGCT-3'	191	Ct trop élevé et produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F61 KDPC-R209	5'-GTGTTACACGTCGTCGT-3' 5'-GTGAACGACTGGCCGAT-3'	149	Produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F712 KDPC-R809	5'-CAGATCAGCACCGCCTAC-3' 5'-GTGTGATCCCGCACGAG-3'	98	Efficacité faible
<i>kdpC</i>	KDPC-F317 KDPC-R416	5'-ACGTCGTCGACACCTTCG-3' 5'-GTCCCTACGGCCATGCT-3'	100	Produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F598 KDPC-R730	5'-ACGCTGACCGACAT-3' 5'-CGTAGGCGGTGCTGATCT-3'	133	Produits secondaires

Gènes	Amorces	Séquences	Fragment (pb)	Statuts
<i>kdpC</i>	KDPC-F416 KDPC-R316	5'GTCCCTACGGCCATGCTG-3' 5'-GACGTCGTCGACACCTTCG-3'	101	Efficacité trop élevée
<i>kdpC</i>	KDPC-F744 KDPC-R600	5'-GACCTGAAGGTCAGCGTAGG-3' 5'-GCTGACCGACGACATCGC-3'	145	Ct trop élevé
<i>kdpC</i>	KDPC-F298 KDPC-R191	5'-ACGCGGACGTGGACGT-3' 5'-TGATCGGCCAGTCGT-3'	108	Efficacité faible
<i>kdpC</i>	KDPC-F342 KDPC-R236	5'-CGGGTCGTCGAAGGTGT-3' 5'-GCTACTTCCAGAGCCG-3'	107	Efficacité trop élevée et facteur de corrélation faible
<i>kdpC</i>	KDPC-F224 KDPC-R143	5'-TTGCCGTTGGCGTCGGT-3' 5'-ACGGCTCGTTCGTCCA-3'	82	Produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F617 KDPC-R502	5'-GCGATGTCGTCGGTCA-3' 5'-TACGACGGCCGGGTGA-3'	116	Produits secondaires
<i>kdpC</i>	KDPC-F866-2 KDPC-R797	5'-TTGAGGCCGAGCACGTT-3' 5'TGCGGGATCACACGA-3'	70	OK
<i>capD</i>	CAPD-F444 CAPD-R580	5'-GTGGCGACTGGTGGAGGA-3' 5'-CGGGGTAATAGGGGCTGT-3'	137	OK
<i>thiC</i>	THIC-F963 THIC-R1092	5'-CGGGGTGCTGCTGCGTTA-3' 5'-GGCGAAGTGGGTGTAGAGGA-3'	130	NoRT
<i>thiC</i>	THIC-F613 THIC-R728	5'-GTGAACCATCCCGAGTCC-3' 5'-ATCTTCTCGACCTCCTCCT-3'	116	Ct trop élevé
<i>thiC</i>	THIC-F17 THIC-R117	5'-GTGATGTGTCGTCCCCTTCT-3' 5'-AAAAACACTCGGGATTCCA-3'	101	Ct trop élevé

Gènes	Amorces	Séquences	Fragment (pb)	Statuts
<i>thiC</i>	THIC-F665 THIC-R733	5'-AGATCAACGCGAACCTCGGCAACT-3' 5'-AGACCATCTTCTCGACCTCCTCCT-3'	69	Ct trop élevé
<i>thiC</i>	THIC-F4 THIC-R115	5'-TCGCCATTCAACCGTGATGTGT-3' 5'-AAACACTCGGGATTTCACCGA-3'	112	OK
<i>sigH</i>	SIGH-F770 SIGH-R845	5'-TCCTGCGCTTCTTCGGCAACAT-3' 5'-CGGGACACGTGCATCTGGGATATT-3'	76	OK
<i>ileS</i>	ILES-F1921 ILES-R1801	5'-TGCCGACGTGCTTGCTCATCTT-3' 5'-TGGTTCTACACCCTGATGGCGA-3'	121	OK
<i>atpD</i>	ATPD-F826 ATPD-R690	5'-GGGTGAACCGGAAGATGT-3' 5'-GGTGTTCGGCCAGATGGA-3'	137	OK
FRAAL3700	FRAAL3700-F382 FRAAL3700-R237	5'-TGAAGAAGGTGTTCGGCGAGC-3' 5'-GTTCTTGGACCCGCAGATGATG-3'	146	Produits secondaires
FRAAL3700	FRAAL3700-F48 FRAAL3700-R114	5'-CTATGACGGCGAACAGGTC-3' 5'-CCAGGCGTACTCGATCTGG-3'	67	Ct trop élevé et produits secondaires
FRAAL3700	FRAAL3700-F367 FRAAL3700-R511	5'-GCCGACACCTTCTTCACCGC-3' 5'-CGATGGTGGCGACCTGC-3'	145	Produits secondaires
FRAAL3700	FRAAL3700-F242 FRAAL3700-R391	5'-TGGACCCGCAGATGATGGG-3' 5'-ACAGGGCGGTGAAGAAGGTGT-3'	150	Ct trop élevé et produits secondaires
FRAAL3700	FRAAL3700-F428 FRAAL3700-R311	5'-GGGGTGGCGTTGTTCGAGT-3' 5'-AGATGATCCTGCACGCGGT-3'	118	OK
FRAAL2028	FRAAL2028-F832 FRAAL2028-R753	5'-CGGGCACTCCCATCATCC-3' 5'-GTGCGACGCCATCTTCTT-3'	80	OK

Gènes	Amorces	Séquences	Fragment (pb)	Statuts
FRAAL2084	FRAAL2084-F310	5'-ACAGCCACTCGTTCTTGG-3'	132	OK
	FRAAL2084-R179	5'-ACGAATGCACCGTCCTG-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F256	5'-AGCTGGAGTAGATCGTGAA-3'	101	Ct trop élevé
	FRAAL2827-R156	5'-GCAGACCGAGACCGAAAT-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F719	5'-GGGGCGTTGAAGTAGTCGT-3'	141	Ct trop élevé
	FRAAL2827-R579	5'-CACCCAGCGGCACATGAA-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F722	5'-AGCGGCACATGAAGCTGTA-3'	138	Ct trop élevé
	FRAAL2827-R584	5'-ATCGGGGCGTTGAAGTAGTC-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F39	5'-AGCCGATGCCTTCTTCCAT-3'	62	Ct trop élevé
	FRAAL2827-R100	5'-TCTGGTCCTTCATGGTTGCT-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F75	5'-TGACGCAGCAACCATGAAGGA-3'	179	Ct trop élevé et produits secondaires
	FRAAL2827-R253	5'-TGGAGTAGATCGTGAAACCGTCCA-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F880	5'-ATCTTCAGCTACTTCCAGATGCCG-3'	149	Efficacité trop élevée
	FRAAL2827-R1028	5'-ATGATGACCAGCGGCGAGAA-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F837	5'-GATGTAGACAGGCGGTTG-3'	101	Efficacité faible
	FRAAL2827-R737	5'-TCTGCCTGTTCGACTACA-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F592	5'-ATGAAGCTGTACGGCACGAA-3'	131	Aucun produit secondaire, courbe standard non effectuée
	FRAAL2827-R723	5'-CATCGGGGCGTTGAAGTAGT-3'		
FRAAL2827	FRAAL2827-F904	5'-GACGAGTACTTCGCCTCCAG-3'	112	OK
	FRAAL2827-R1016	5'-GGCGAGAAGTGGTCGTAGAG-3'		

Les couples d'amorces utilisés pour les essais de q-PCR sont surlignés en gris.

BIBLIOGRAPHIE

- Alahari, A., Ballal, A., and Apte, S. K. (2001). Regulation of potassium-dependent Kdp-ATPase expression in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena torulosa*. *J Bacteriol.* 183: 5778-5781.
- Allard, S. T. M., Cleland, W. W., and Holden, H. M. (2004). High Resolution X-ray Structure of dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase from *Streptomyces venezuelae*. *J Biol Chem.* 279: 2211-2220.
- Al-Shawi, M. K., Ketchum, C. J., and Nakamoto, R. K. (1997). Energy coupling, turnover, and stability of the F₀F₁ ATP synthase are dependent on the energy of interaction between γ and β subunits. *J Biol Chem.* 272: 2300-2306.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M., and Iyer, L. M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 231-262.
- Baker, D. D. and Schwintzer, C. R. (1990). Introduction. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants, Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D., eds. (San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto : Academic Press inc.) pp. 1-13
- Ballal, A., Basu, B., and Apte, S. K. (2007). The Kdp-ATPase system and its regulation. *J Biosci.* 32: 559-568.
- Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Sola-Landa, A., and Martín, J. F. (2013). Transcriptional control of the F₀F₁-ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microb Biotechnol.* 6: 178-188.
- Bélanger, P., Beaudin, J., and Roy, S. (2011). High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. *J Microbiol Methods.* 85: 92-97.
- Benson, D. R. and Schultz, N. A. (1990). Physiology and biochemistry of *Frankia* in culture. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants, Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D., eds. (San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto : Academic Press inc.) pp.107-127
- Benson, D. R., and Silvester, W. B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev.* 57: 293-319.

- Bergwitz, C., and Jüppner, H. (2011). Phosphate Sensing. *Adv Chronic Kidney Dis.* 18: 132-144.
- Bernèche-D'Amours, A. (2012). Étude de la différenciation cellulaire en hyphes toruleux chez l'actinomycète *Frankia alni* ACN14a. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.
- Bernèche-D'Amours, A., Ghinet, M. G., Beaudin, J., Brzezinski, R., and Roy, S. (2011). Sequence analysis of *rpoB* and *rpoD* gene fragments reveals the phylogenetic diversity of actinobacteria of genus *Frankia*. *Can J Microbiol.* 57: 244-249.
- Berry, A. M., Harriott, O. T., Moreau, R. A., Osman, S. F., Benson, D. R., and Jones, A. D. (1993). Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 6091-6094.
- Blank, L. M. (2012). The cell and P: From cellular function to biotechnological application. *Curr Opin Biotechnol.* 23: 846-851.
- Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev.* 49: 359-378.
- Chaia, E. E., Wall, L. G., and Huss-Danell, K. (2010). Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. A review. *Symbiosis.* 51: 201-226.
- Corratgé-Faillie, C., Jabnoute, M., Zimmermann, S., Véry, A., Fizames, C., and Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: The Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol Life Sci.* 67: 2511-2532.
- Curtis, P. D., and Brun, Y. V. (2010). Getting in the loop: Regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74: 13-41.
- Diem, H. G., and Dommergues, Y. R. (1985). *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS 021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant Soil.* 87: 17-29.
- Dworkin, M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (Springer Sciences + Business media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA) pp. 185-220.
- Epstein, W. (2003). The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 75: 293-320.
- Fontaine, M. S., Lancelle, S. A., and Torrey, J. G. (1984). Initiation and ontogeny of vesicles in cultured *Frankia* sp. strain HFPArl3. *J Bacteriol.* 160: 921-927.

Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol.* 2: 898-907.

Fournier, G. P., Andam, C. P., Alm, E. J., and Gogarten, J. P. (2011). Molecular Evolution of Aminoacyl tRNA Synthetase Proteins in the Early History of Life. *Orig Life Evol Biosph.* 41: 621-632.

Gaster, M., Nehlin, J. O., and Minet, A. D. (2012). Impaired TCA cycle flux in mitochondria in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects: Marker or maker of the diabetic phenotype? *Arch Physiol Biochem.* 118: 156-189.

Greie, J. (2011). The KdpFABC complex from *Escherichia coli*: A chimeric K⁺ transporter merging ion pumps with ion channels. *Eur J Cell Biol.* 90: 705-710.

Haapalainen, A. M., Meriläinen, G., and Wierenga, R. K. (2006). The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends Biochem Sci.* 31: 64-71.

Hegeman, A. D., Gross, J. W., and Frey, P. A. (2001). Probing catalysis by *Escherichia coli* dTDP-glucose-4,6-dehydratase: identification and preliminary characterization of functional amino acid residues at the active site. *Biochemistry.* 40: 6598-6610.

Hegeman, A. D., Gross, J. W., and Frey, P. A. (2002). Concerted and stepwise dehydration mechanisms observed in wild-type and mutated *Escherichia coli* dTDP-glucose 4,6-dehydratase. *Biochemistry.* 41: 2797-2804.

Hirota, R., Kuroda, A., Kato, J., and Ohtake, H. (2010). Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. *J Biosci Bioeng.* 109: 423-432.

Hobbs, G., Obanye, A. I., Petty, J., Mason, J. C., Barratt, E., Gardner, J. C., Flett, F., Smith, C. P., Broda, P., and Olivier, S. G. (1992). An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 174: 1487-1494.

Horinouchi, S., and Beppu, T. (2007). Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 83: 277-295.

Hug, I., and Feldman, M. F. (2011). Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology.* 21: 138-151.

Igual, J. M., and Dawson, J. O. (1999). Stimulatory effects of aluminum on in vitro growth of *Frankia*. *Can J Bot* 77: 1321-1326.

Kim, Y. J., Moon, M. H., Song, J. Y., Smith, C. P., Hong, S., and Chang, Y. K. (2008). Acidic pH shock induces the expressions of a wide range of stress-response genes. *BMC Genomics*. 9: 604

Krulwich, T. A., Sachs, G., and Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 9: 330-343.

Krumholz, G. D., Chval, M. S., McBride, M. J., and Tisa, L. S. (2003). Germination and physiological properties of *Frankia* spores. *Plant Soil* 254: 57-67.

Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., and Withers, S. G. (2008). Glycosyl transferases: Structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*. 77: 521-555.

Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. (1990). Systematics, isolation, and culture of *Frankia*. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants, Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D., eds. (San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto : Academic Press inc.) pp.35-60

Lee, S. W., Cho, B. H., Park, S. G., and Kim, S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: Beyond translation. *J Cell Sci*. 117: 3725-3734.

Martín, J. F., Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Smith, M. C. M., Ellingsen, T. E., Nieselt, K., Burroughs, N. J., Wellington, E. M. (2012). Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 95: 61-75.

Matsumoto, Y., Murakami, Y., Tsuru, S., Ying, B., and Yomo, T. (2013). Growth rate-coordinated transcriptome reorganization in bacteria. *BMC Genomics*. 14: 808

Meriläinen, G., Poikela, V., Kursula, P., and Wierenga, R. K. (2009). The thiolase reaction mechanism: the importance of Asn316 and His348 for stabilizing the enolate intermediate of the Claisen condensation. *Biochemistry*. 48: 11011-11025.

Moussard, C. (2006) Énergétique cellulaire, le cycle de l'acide citrique. *Biochimie structurale et métabolique*. (Bruxelles, Éditions De Boeck Université) pp. 225-236.

Murry, M. A., Fontaine, M. S., and Torrey, J. G. (1984). Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPArI 3 grown in batch culture. *Plant Soil*. 78: 61-78.

Normand, P., and Lalonde, M. (1982) Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenance of two *alnus* species. *Can J Microbiol* 28: 1133-1142.

Okamura, E., Tomita, T., Sawa, R., Nishiyama, M., and Kuzuyama, T. (2010). Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in the mevalonate pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 107: 11265-11270.

- Oke, V., and Long, S. R. (1999). Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol Microbiol.* 32: 837-849.
- Palmer, L. D., Dougherty, M. J., and Downs, D. M. (2012). Analysis of thic variants in the context of the metabolic network of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 194: 6088-6095.
- Persson, T., Benson, D. R., Normand, P., Heuvel, B. V., Pujic, P., Chertkov, O., Teshima, H., Bruce, D. C., Detter, C., Tapia, R. *et al.* (2011). Genome sequence of "*candidatus frankia datisca*" Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *datisca glomerata*. *J Bacteriol.* 193: 7017-7018.
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H., and Fiedler, H. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotechnol.* 80: 135-142.
- Salowe, S. P., Wiltsie, J., Hawkins, J. C., and Sonatore, L. M. (2009). The catalytic flexibility of tRNA^{Ile}-lysine synthetase can generate alternative tRNA substrates for isoleucyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 284: 9656-9662.
- Schwencke, J., and Carú, M. (2001). Advances in actinorhizal symbiosis: host plant-*Frankia* interactions, biology, and applications in arid land reclamation. *Arid Soil Res Rehabil.* 15: 285-327.
- Sevciková, B., Benada, O., Kofronova, O., and Kormanec, J. (2001). Stress-response sigma factor σ^H is essential for morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol.* 177: 98-106.
- Sevcikova, B., Rezuchova, B., Homerova, D., and Kormanec, J. (2010). The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor H in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol.* 192: 5674-5681.
- Sirois, J., Bizier, E., and Cardin-Bernier, G. (2012). Method of identifying endogenous fluorescent biological markers for monitoring cells. *Patent Application Publication* 13/124,514: 1-15.
- St Leger, R. J., Nelson, J. O., and Screen, S. E. (1999). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology.* 145: 2691-2699.
- Taboada, H., Encarnación, S., Vargas, M. D. C., Mora, Y., Miranda-Ríos, J., Soberón, M., and Mora, J. (2008). Thiamine limitation determines the transition from aerobic to fermentative-like metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *FEMS Microbiol Lett.* 279: 48-55.

- Tjepkema, J. D., Ormerod, W., and Torrey, J. G. (1981). Factors affecting vesicle formation and acetylene reduction (nitrogenase activity) in *Frankia* sp. CpII. *Can J Microbiol.* 27: 815-823.
- Valdés, M. (2008) *Frankia* ecology. Nitrogen-fixing actinorhizal symbiosis, Pawlowski, K. and Newton, W. E., eds. (The Netherlands: Springer), pp.49-71
- Valverde, C. and Huss-Danell, K. (2008). Carbon and nitrogen metabolism in actinorhizal nodules. Nitrogen-fixing actinorhizal symbiosis, Pawlowski, K. and Newton, W. E., eds. (The Netherlands: Springer), pp.167-198
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.1-0034.11.
- Viollier, P. H., Minas, W., Dale, G. E., Folcher, M., and Thompson, C. J. (2001). Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol.* 183: 3184-3192.
- Wheeler, C. T., Akkermans, A. D. L., and Berry, A. M. (2008). *Frankia* and actinorhizal plants: a historical perspective. Nitrogen-fixing actinorhizal symbiosis, Pawlowski, K. and Newton, W. E., eds. (The Netherlands: Springer), pp.1-24
- Yan, H., Fukamachi, T., Saito, H., and Kobayashi, H. (2011). Expression and activity of Kdp under acidic conditions in *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull.* 34: 426-429.
- Yang, J., Tauschek, M., and Robins-Browne, R. M. (2011). Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends Microbiol.* 19: 128-135.
- Young, K. D. (2007). Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol.* 10: 596-600.
- Young, K. D. (2006). The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70: 660-703.
- Zhang, Y. I., Taylor, S. V., Chiu, H., and Begley, T. P. (1997). Characterization of the *Bacillus subtilis* *thiC* operon involved in thiamine biosynthesis. *J Bacteriol.* 179: 3030-3035.
- Zinder, S. H., and Dworkin, M. (2006). Morphological and Physiological Diversity. *Prokaryotes Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology.*

